

ステロイドの微生物変換機構に関する立体化学的研究

著者	池川 繁男
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	164
URL	http://hdl.handle.net/10097/46006

ステロイドの微生物変換機構に
関する立体化学的研究

東北大学薬学部薬品分析化学教室

池 川 繁 男

正 誤 表

池 川 繁 男

ページ	行	誤	正
目次	19	Androstendione	Androstenedione
	25	Cholestesterols	Cholesterols
2	8	体謝	代謝
5	1	dibprane	diborane
6	13	deuteriobration	deuterioboration
7	6	<i>restriclus</i>	<i>restrictus</i>
8	15	<i>restriclus</i>	<i>restrictus</i>
8	19	<i>reetrictus</i>	<i>restrictus</i>
9	4	符号	符合
10	5	<i>restricus</i>	<i>restrictus</i>
10	13	<i>restatus</i>	<i>restrictus</i>
11	7	<i>Nocadia</i>	<i>Nocardia</i>
11	10	extrract	extract
12	2	<i>restictus</i>	<i>restrictus</i>
13	6	drotesterone	drotestosterone
13	14	<i>ter</i>	<i>tert</i>
13	18	<i>Penicillim decumens</i>	<i>Penicillium decumbens</i>
15	11	誰測	推測
15	26	対	付
15	27	35 α	35a
17	17	androstendione	androstenedione
18	5	epimerie	epimeric
21	3	符号	符合
25	4	<i>Artrobacter</i>	<i>Arthrobacter</i>
27	15	oxdase	oxidase
27	21	6 β	6
27	26	フッ素化水素	フッ化水素
28	11	actate	acetate
29	20	acete	acetate
31	27	proparative	preparative
32	5	siglet	singlet
35	5	SP	PS
35	7	ママスペクトル	マスペクトル
36	23	0.2 mg	0.2 ml
55	17	prerative	preparative
55	21	6 β -d ₁ -5 α -Cholestan-3 β , 5-diol	6 β -d ₁ -5 α -Cholestane-3 β , 5-diol
65	28	Voll	Vol

目 次

緒 論	1
第 1 章 5β -3-ケトステロイドの脱水素機構	4
第 1 節 序	4
第 2 節 Epimeric 2-および $4-d_1$ - 5β -Androstane-3, 17-diones の合成	4
第 3 節 <i>Nocardia restrictus</i> の Cell-free Extract による 2-および $4-d_1$ - 5β -Androstane-3, 17-diones の脱水素	7
第 4 節 結 論	8
第 2 章 5α -3-ケトステロイドの脱水素機構	10
第 1 節 序	10
第 2 節 Epimeric $4-d_1$ - 5α -Androstane-3, 17-diones の合成	10
第 3 節 <i>Nocardia restrictus</i> の Cell-free Extract による Epimeric $4-d_1$ - 5α -Androstane-3, 17-diones の脱水素	11
第 4 節 結 論	12
第 3 章 4^4 -3-ケトステロイドの水素添加機構	13
第 1 節 序	13
第 2 節 $4-d_1$ -Testosterone および $4-d_1$ -Androstenedione の合成	13
第 3 節 <i>Penicillium decumbens</i> による $4-d_1$ -Androstendione の水素添加	17
第 4 節 結 論	20
第 4 章 コレステロールの Androsta-1, 4-diene-3, 17-dione への 変換における脱水素機構	22
第 1 節 序	22
第 2 節 Epimeric 2-および $4-d_1$ -Cholestesterols の合成	22
第 3 節 <i>Arthrobacter simplex</i> による 2-および $4-d_1$ -Cholesterols の変換	25
第 4 節 結 論	26

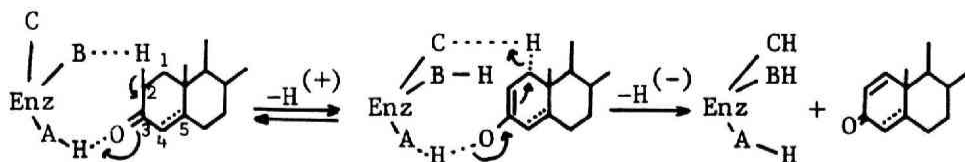
第 5 章 Cholesterol の Cholestenone への変換における $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$	
異性化の機構	27
第 1 節 序	27
第 2 節 Epimeric 6- Δ_1 -Cholestenones の合成	27
第 3 節 3 β -Hydroxysteroid Oxidase による Epimeric 4-および 6- Δ_1 -Cholesterols の変換	29
第 4 節 結 論	33
実 験 の 部	35
第 1 章第 2 節付属実験	35
第 1 章第 3 節付属実験	39
第 2 章第 2 節付属実験	40
第 2 章第 3 節付属実験	41
第 3 章第 2 節付属実験	42
第 3 章第 3 節付属実験	48
第 4 章第 2 節付属実験	50
第 4 章第 3 節付属実験	55
第 5 章第 2 節付属実験	55
第 5 章第 3 節付属実験	57
引 用 文 献	62

緒 論

微生物変換はそれが産生する酵素を利用する反応であり、化学的な合成法と比べ容易に、しかも収率よく目的物を得ることができる。そのためこれまでに多くの研究がなされ、特に顕著な生理活性を有するステロイドの分野では幾多の興味ある変換が見い出されている。¹⁾ これは微生物が高等な動植物に比してライフサイクルが早く、また培養条件のコントロールや無細胞系の分離が容易で合成手段としてきわめて有利なためである。このように微生物変換は主として実用上の要求からステロイドを中心に研究が展開されてきたが、その成果として、たとえば土壤菌による 11β -水酸化と細菌による Δ^1 脱水素反応の発見により、副腎皮質ホルモンの大量生産が可能となったことがあげられる。また今日補充療法ホルモン剤としてのみならず抗炎症剤、蛋白同化剤、低コレステロール剤等として優れた薬理効果の賞用されているステロイドホルモンの重要な中間体（たとえば $\text{androsta-1,4-diene-3,17-dione}$ ）が、安価にかつ容易に入手出来るステロール（ cholesterol , stigmasterol , β -sitosterol など）の微生物変換により一段階で、しかも収率よく得られるようになったこともその成果の一つとして注目に値する。

一方、近年微生物による変換反応が高等動物における生合成や酵素反応のモデルとして生物化学の領域でも重要な位置を占めるようになってきた。とりわけステロイドのA環にみられる脱水素反応、水素添加反応はヒトにおける estrogen や androgen などの生合成機構と関連して興味をもたれるため、これまでその機構を解明すべく多くの研究が行なわれてきた。すなわち testosterone , androstenedione などの内因性 C_{19} ステロイドは胎盤、卵巣において estrogen に変換される²⁾が、この酵素的芳香化に際してはC-10メチル基の脱離とC-1およびC-2水素の脱離、すなわちA環への二重結合の導入が必要であり³⁾、重水素あるいはトリチウム標識法によって 1β -, 2β -水素の cis 脱離が立体選択的に起こることが証明されている。⁴⁻⁹⁾ これに反し、微生物によるこの種の Δ^1 脱水素反応は 1α -, 2β -水素の trans 脱離であることが明らかとなっている。^{3, 10)} すなわち、Ringold ら¹¹⁾ は 1α -および 1β -methyl- 17β -hydroxy- 5α -androstan-3-one を基質とし、*Bacillus sphaericus* とインキュベートした際、 1β -methyl 体からのみ Δ^1 -en-3-one を生成することから 1α -水素が立体選択的に脱離すると考え、さらに 1α - d_1 - 5α -androstan-3,17-dione を基質に用いることによりこれを証明した。¹²⁾ 他方C-2水素脱離についても同様に 2α -hydroxy-および 2α -methyl-androst-4-ene-3,17-dione は *Bacillus sphaericus* の基質となるが、 2β -hydroxy 体は基質となり得ないことが見い出され¹¹⁾、さらに 2β 重水素標識基質を用いることにより、 β -水素に特異的であることが明らかにされた。¹²⁾ Jerussi ら¹³⁾ はこれらの事実にもとづきC-1, C-2の重水素標識基質を用いてこの脱水素反応のKinetic, isotope effectを検討し、Fig. 1

に示すような機構を提唱している。



(A=Proton donor B=Proton acceptor C=Hydride acceptor)

Fig.1 : Proposed Mechanism of Enzymatic Dehydrogenation

一方, testosteroneに代表される d^4 -3-ketosteroidが肝, 前立腺によって 5α -および 5β -di hydro 体に変換される際, 5位へは補酵素からの水素が^{14,20)}, 一方, 4位へは培地からの水素が付加する¹⁴⁾ことが明らかにされている。しかしながら微生物によるこの種還元機構に関する研究はきわめてとぼしい。すなわち腸内細菌による cholestenone の coprostanone への変換の際5位の水素は補酵素に由来することが明らかにされている²¹⁾のみで, 4位水素付加の立体化学については何ら検討がなされていない。

近年, ^2H , ^{13}C , ^{15}N など非放射性的の安定同位元素が反応機構の解析のみならず, 生合成, 代謝などの研究にトレーサーとして広く用いられている。とりわけ基質の重水素標識は酵素反応における水素原子の挙動を知る上できわめて有用な手段である。

本論文はこのような観点から微生物による脱水素, 水素添加, さらに二重結合の異性化をとりあげ, それらの機構を isotope technique を駆使して立体化学の立場から検討したものである。

まず臭素あるいはメチル基で標識した基質を用いてしか検討がなされていない 5α -および 5β -3-ketosteroid の脱水素反応をとりあげた。すなわち2位あるいは4位を立体特異的に重水素標識した 5α -および 5β -androstane-3, 17-dioneを合成し, これら基質について *Nocardia restrictus*によるC-2, C-4からの水素脱離の立体選択性を検討した。ついで脱水素反応の機構とも関連して興味をもたれることから $4-d_1$ -androstene-3, 17-dione を合成し, これを基質として *Penicillium decumbens* による4位水素付加の立体化学を検討し, シフト試薬を用いる核磁気共鳴(NMR)スペクトルを駆使してそれを明らかにした。

ステロイドホルモンの工業的製造法として古くからステロールの微生物変換が試みられているが *Arthrobacter simplex* による cholesterol の androsta-1,4-diene-3, 17-dione (ADD) への変換におけるC-2, C-4からの水素脱離もこのような観点から興味深いものがある。そこで cholesterolの2位および4位を立体特異的に重水素標識し, これを基

質として *Arthrobacter simplex* による変換を行ない，C-2，C-4 水素脱離の立体選択性を検討した。

最後に 3β -hydroxysteroid oxidase による cholesterol の cholestenone への変換における C-4 および C-6 水素の挙動について検討を加えた。

第1章 5β -3ケトステロイドの脱水素機構

第1節 序

5β -3-Ketosteroid が種々の微生物により脱水素化され、1, 2位および4, 5位間に二重結合が導入されることはよく知られている。¹⁾ しかしその機構に関してはAbul-Hajjの研究²²⁾がみられるのみである。すなわち4 β 位に臭素あるいはメチル基を置換した 5β -androsterone-3, 17-dioneを*Nocardia restrictus*のcell-free extractとインキュベートし、いずれの基質からも4 α -3-keto体が得られることから一般に4 α -不飽和化は4 α - 5β -水素のtrans脱離であると結論している。しかしながら臭素、メチル基は水素とは異なってかさ高く、しかも基質に4 β 置換体しか用いていないなど、酵素反応の立体化学を論ずるための方法論として必ずしも適切とはいえない。そこで著者は 5β -3-ketosteroidの4 β , 4 α -不飽和化における水素脱離の機構を明らかにするためより適切な基質としてC-2, C-4を立体特異的にそれぞれ重水素標識した 5β -androsterone-3, 17-dione 4種を合成した。ついでこれらを基質とし、*Nocardia restrictus*のcell-free extractによる脱水素反応を検討した。

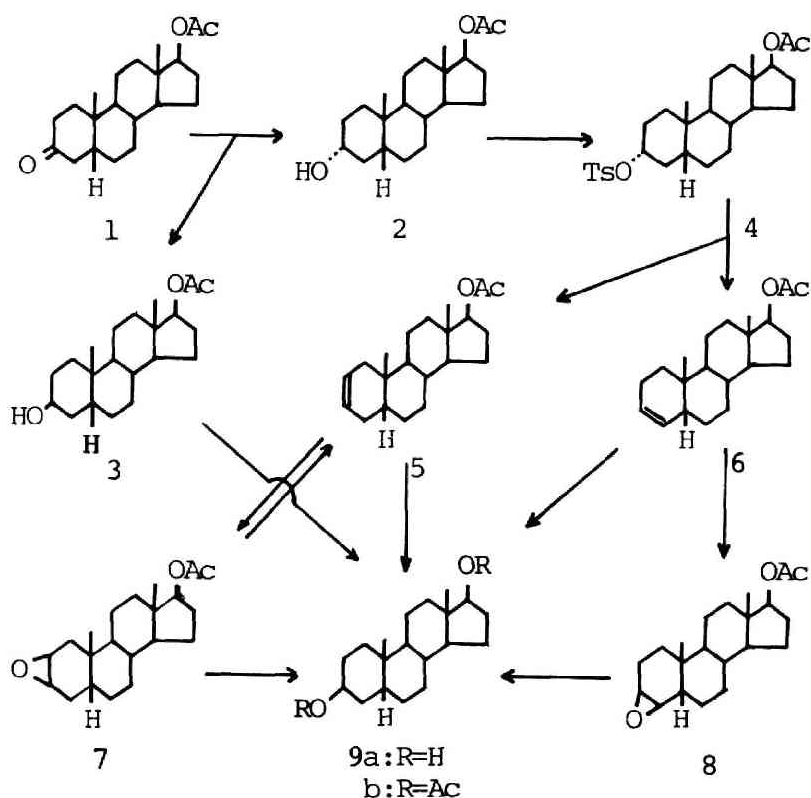
第2節 Epimeric 2-および4-d₁-5 β -Androsterone-3, 17-dionesの合成²³⁾

微生物による5 α -および4 α -3ケトステロイドの4 α -不飽和化反応における水素脱離の立体化学を検討する目的で、C-1, C-2を重水素標識した基質の合成が今日まで種々試みられている。すなわちC-1重水素標識に関しては17 β -hydroxy-5 α -androsterone-3-oneを出発原料とし、接触還元を標識手段に用い数工程を経て1 α -d₁-5 α -androsterone-3, 17-dioneを、¹³⁾ 一方 androst-1, 4-diene-3, 17-dione を接触還元、アルカリ処理に付して1 β -d₁-androsterone-4-ene-3, 17-dioneを得ている。¹²⁾ また、C-2重水素標識体については2 α -iodoandrosterone-4-ene-3, 17-dione を重酢酸中亜鉛末で処理して2 α -d₁-androsterone-4-ene-3, 17-dioneを合成している。¹³⁾ さらにRingoldらは2 α , 3 α -epoxy-5 α -androsterone-17-one を重水素化アルミニウムリチウム(LiAlD₄)で還元的に開環後、酸化して2 β -d₁-5 α -androsterone-3, 17-dioneを製している。¹²⁾ しかしながらA_B-cisステロイドではこの種の検討がなされていない。一般に重水素標識を伴うmonohydroxy化合物の合成にはカルボニル基の還元その他、二重結合へのdiboraneの付加ならびに水素化アルミニウムリチウム(LiAlH₄)によるepoxideの還元的開裂が用いられる。このときdiboraneの付加反応はcisに、一方LiAlH₄の還元的開裂反応はtrans-diaxialに進行することはよく知られている。²⁴⁾ さらに5 β -ステロイドではA_B環が α 側に折れ曲った構造をとるためA環二重結合に対する

dibprane, 過酸など試薬の攻撃は β 側からの方が優位と考えられる。したがって中間体に 4^2 体, 4^3 体を用い, これらの反応を駆使することにより目的とする化合物が得られるものと期待される。そこでまず重要な中間体となる 4^2 -および 4^3 -androstene 誘導体の合成を行なった。

まず testosterone を出発原料とし, 1.5%メタノール性水酸化カリウム中パラジウム炭触媒下接触還元を行ない 5β -H体とした。これを常法通りピリジン-無水酢酸でアセチル化して 17β -acetoxy- 5β -androstan-3-one(1)に導いたのち, 氷冷下水素化ホウ素ナトリウム(NaBH_4)で還元し 3α -hydroxy 体(2)と少量の 3β -hydroxy 体(3)を得た。NMRスペクトルにおいて(2)の3位プロトンは $3.30-3.80$ ppmに $W_{1/2}=20$ Hzのmultipletとして観察されるのに対して,(3)のそれは 4.10 ppmに $W_{1/2}=7$ Hzのmultipletとして観察された。一般に水酸基の根元のプロトンはaxial性の方がequatorial性のものより高磁場に観察され, また $W_{1/2}$ も大きいことが知られている。²⁵⁾したがって(2)は 3α -hydroxy 体, 一方(3)は 3β -hydroxy 体と考えられたが(2)および(3)のアセチル化物をそれぞれの標品と比較したところ完全に一致した。(2)をピリジン中tosyl chlorideと処理して3-tosylate(4)に誘導し, ついで γ -コリジン中加熱還流して3位tosyl基の脱離を試みた。反応成績体はシリカゲルの薄層クロマトグラフィー(TLC)では単一のスポットを与えたが硝酸銀含有シリカゲルのTLCにより²⁵⁻²⁶⁾, 量比が約1:2からなる異性体混合物であることが判明した。そこで分別再結晶をくり返して主生成物を単離し, 5β -androstan- $3\text{-en-}17\beta\text{-ol acetate}$ (6)と同定した。一方, 極性の強い異性体は分離精製が不可能であったため, 以下の反応を行ない単離した。すなわち先の再結晶母液を(6)との混合物のままm-クロル過安息香酸を用いてエポキシ化に付した。生成した2種の成績体はシリカゲルTLCで明確に分離し, その一つは(6)より誘導した $3\beta, 4\beta$ -epoxide(8)と一致した。他のepoxideはそのNMRスペクトルにおいて, エポキシ基の根元のプロトンにもとづくシグナルが $2.90-3.30$ ppmにmultipletとして観察されることから $2\beta, 3\beta$ -epoxide(7)と同定された。つぎに(7)を酢酸中ヨウ化ナトリウム, 酢酸ナトリウムおよび亜鉛末とともに室温で攪拌し, 先に単離できなかった 4^2 体(5)を得た。ここで(5)と(6)のNMRスペクトルを比較すると, 前者では 5.56 ppmに2位と3位のプロトンに帰属されるシグナルが2H分のbroad singletとしてみられるのに対し, 後者では3位と4位のプロトンに帰属されるシグナルが $5.18-5.84$ ppmにmultipletとして観察された。これらの事実から(5)は明らかに 17β -acetoxy- 5β -androstan-2-eneと思われたが, さらに再度エポキシ化するとき(7)が得られることから最終的に確認した。

つぎに(5), (6)およびそれらに対応する β -epoxide(7, 8)を原料として重水素導入のための予試験を行なった。すなわち(5)および(6)をそれぞれdiboraneを用いるhydroboration, ついでアルカリ性過酸化水素で酸化して 5β -androstan- $3\beta, 17\beta$ -diol(9a)を得た。一方(7), (8)を無水テトラヒドロフラン(THF)中 LiAlH_4 と加熱還流してエポキシ環の還元的開裂を行



Ac: CH_3CO- , Ts: $p-CH_3C_6H_4SO_2-$

Chart 1

ない、先と同様 diol 体 (9a) を得た。(9a) の構造は常法通りアセチル化して diacetate (9b) に導き標品と比較し確認した。この結果 diborane は (5), (6) に対してより立体障害の少ない β 側より攻撃し、また $LiAlH_4$ は (7), (8) のエポキシ環を還元的に開裂し、ともに axial の β -hydroxy 体を生成することが明らかとなった。以上の結果、 $LiAlD_4$ および deuteriodiborane を用いることにより 5 β -androstane-3, 17-dione の 2 位および 4 位に重水素を立体特異的に導入しうる可能性が明らかとなった。

そこで無水エーテル溶液中 $LiAlD_4$ と三フッ化ホウ素を用い、先と同様の条件下 (5) を deuterioboration, ついでアルカリ性過酸化水素酸化に付して 2 β - d_1 -3 β , 17 β -diol (12) を得、さらにクロム酸-ピリジン試薬で緩和な条件下酸化し 2 β - d_1 -5 β -androstane-3, 17-dione (13) を製した。つぎにエポキシ体 (7) を無水 THF 中 $LiAlD_4$ と反応させ 2 α - d_1 -3 β , 17 β -diol (10) としたのち (12) の場合と同様クロム酸で酸化して 2 α -D 体 (11) を得た。一方、4 α -D 体および 4 β -D 体 (15, 17) も (8) および (6) を用い先と同様それぞれ deuteriodiborane による deuterioboration と $LiAlD_4$ 還元を付し、ついでクロム酸-ピリジンで酸化して製した。

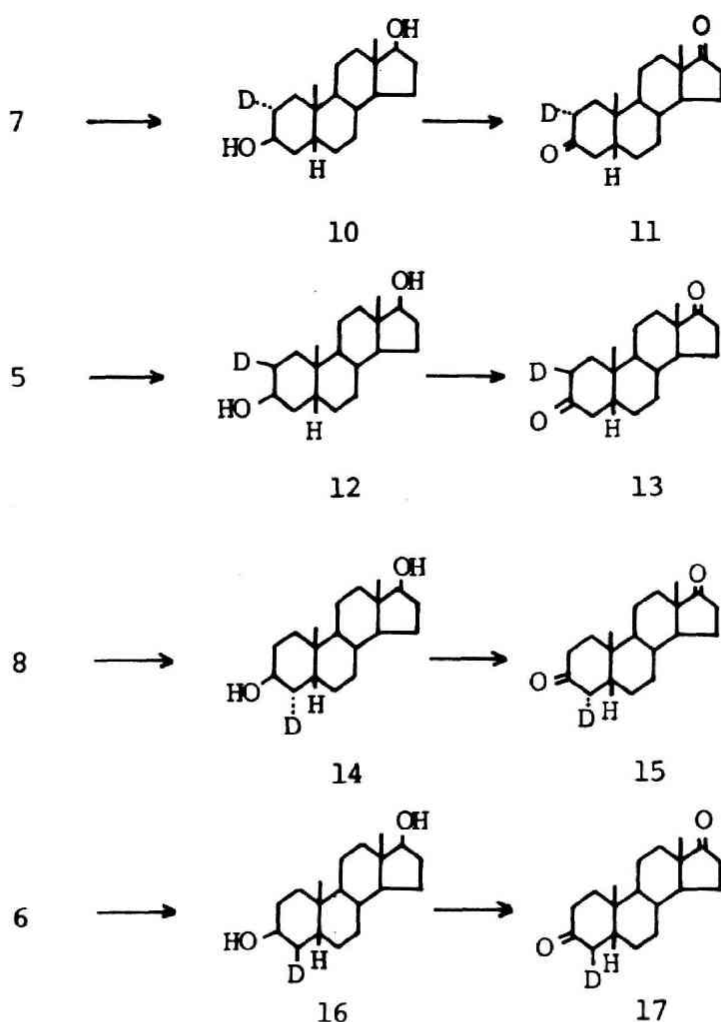


Chart 2

ここに得られた(11)，(13)，(15)および(17)は(10)と混融して融点降下を示さず，またそれぞれ異なった赤外線吸収(IR)スペクトルを与えることから，相互に異性体であることが確認された。またこれら重水素標識化合物はいずれもマススペクトル(MS)においてその分子イオンピークが(10)のそれに比し1 mass unit 多い m/e 289に観察され，さらにその解析から98%以上重水素を含有することが判明した。

第3節 *Nocardia restrictus* のCell-free Extract による2-および

4- d_1 -5 β -Androstane-3,17-diones の脱水素^{29, 30)}

A環の不飽和化におけるC-2およびC-4水素脱離の立体化学を明らかにするため、前節で合成法を述べた epimeric 2-および4-d₁-5β-androstane-3,17-dione を基質に用い *Nocardia restrictus* の cell-free extract による変換を行なった。

Sihら³¹⁾の方法に準じて調製した cell-free extract を酵素源に用い、電子受容体として phenazine methosulfate (PMS) を加え、それぞれの基質とともに27°に20 hr インキュベートした。このインキュベーション混合物を酢酸エチルで抽出し、preparative TLC に付して4⁺体および4¹⁺体をそれぞれ約40%の収率で得た。ついでこれら変換成績体のMSを測定し、分子イオンピークから重水素の保持率を算出してTable I に示す結果を得た。すなわち2α-D体および2β-D体を基質とした場合、生成した4⁺体はそれぞれ92%, 85%の重水素保持率を示した。この結果は標識重水素が酵素反応の過程で非酵素的に脱離し難いことを立証している。また同時に生成した4¹⁺体においてはその重水素保持率が2α-D体を基質とした場合89%と高いのに対し、2β-D体では全く保持されていなかった。一方、4α-D体を基質としたとき、生成した4⁺体、4¹⁺体はともに標識重水素がほとんど消失しているのに対し、4β-D体では約80%の保持率が認められた。

Table I Deuterium Retention of Products
in Microbial Dehydrogenation

Product	Substrate(%)			
	2α-D(11)	2β-D(13)	4α-D(15)	4β-D(17)
Androsta-1,4-diene-3,17-dione	89	0	2	78
Androst-4-ene-3,17-dione	92	85	6	77

以上の結果、5β-androstane-3,17-dione が *Nocardia restrictus* の cell-free extract によって脱水素される場合、C-2位においてはβ-水素が、一方C-4位においてはα-水素が立体選択的に脱離することが明らかとなった。

第4節 結 論

Nocardia restrictus の cell-free extract による5β-androstane-3,17-dione の androst-4-ene-3,17-dione への変換の際、C-4位における水素脱離はaxialの4α-水素に立体選択的であることが明らかとなった。また、このとき同時に生成する androsta-1,4-diene-3,17-dione においても4α-水素が立体選択的に脱離することが認められたが、

これらの結果から $\Delta^{1,4}$ 体生成の経路はつぎのように推測される。すなわち $\Delta^{1,4}$ 体生成の中間体としては Δ^1-3 -keto 体, Δ^4-3 -keto 体の 2 つが考えられる。しかしながら Δ^4-3 -keto 体が中間体であると考えたと axial 水素が脱離することとなり, Δ^4 体生成の際の C-4 水素脱離の結果とよく符号する。したがって $\Delta^{1,4}$ 体の生成は Δ^4-3 -keto 体を中間に經由して進行する可能性の方が大であろう。

C-2 位における水素脱離に関しても 2β -水素のとり立体配座は A 環の構造に依存するため $5\beta-3$ -keto 体からの脱離と Δ^4-3 -keto 体からの脱離の 2 通りがある。しかしながら先にも述べたように $\Delta^{1,4}$ 体は Δ^4 体を経て生成することが C-4 水素脱離の結果から支持されることから, C-2 位における水素脱離は Δ^4-3 -keto 体の 2β -水素に特異的であるとされる。このことは *Bacillus sphaericus* による androst-4-ene-3,17-dione の $\Delta^{1,4}$ 体への変換の際, 2β -水素が立体選択的に脱離するという Jerussi ら¹³⁾ の知見とよく一致する。しかし, 他方, 5β -pregnane-3,11,20-trione の *Septomyxa affinis* による Δ^1 不飽和化における水素脱離は equatorial の 2β -水素に特異的であるという報告³²⁾ もみられ, $\Delta^{1,4}$ 体生成の中間体として Δ^1-3 -keto 体を完全に否定することはできない。ところで 3-ketosteroid の微生物による脱水素反応では一般に酵素と基質との結合にカルボニル基のエノール化が考えられている。¹⁰⁻¹³⁾

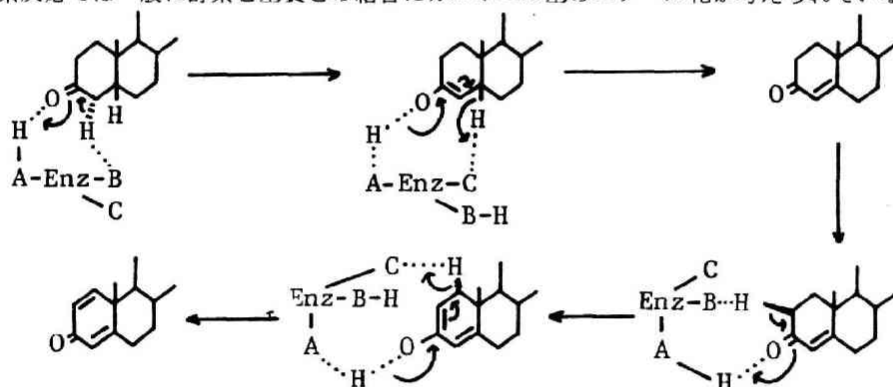


Fig.2 : Possible Mechanism for Microbial Dehydrogenation

Enz : Enzyme, A : Proton donor, B : Proton acceptor

C : Hydride acceptor

脱水素反応についても Fig.2 に示すようなエノール体が関与する機構で説明される。

すなわち, まず基質の 3 位カルボニル基が protonation を受け, 4α -axial 水素が立体選択的に脱離し Δ^3 -エノール中間体となったのち, 5β -水素が hydride ion として脱離し, Δ^4-3 -keto 体を生成する。ついで 4 位脱水素の場合と同様, 2β -水素が脱離し, $\Delta^{2,4}$ -ジエノール中間体を経て $\Delta^{1,4}$ 体を生成する。

第2章 5α - 3 -ケトステロイドの脱水素機構³³⁾

第1節 序

微生物による 3 -ケトステロイドの脱水素反応においては一般に基質のカルボニル基のエノール化が考えられており、 α 位のaxial水素の脱離がみられる。¹⁰⁻¹³⁾第1章において 5β -androsterane- $3,17$ -dioneが*Nocardia restrictus*のcell-free extractにより d^4 、 $d^{1,4}$ 体を生成する際 2β 、 4α 位の水素が立体選択的に脱離することを明らかにしたが、 4 位においてはaxial水素が、一方 2 位についてはまず d^4 体が生成し、ついで 2β -水素が脱離して $d^{1,4}$ 体を生成したと考えられる。ところで 5α 系の 4 位水素脱離の機構については立体特異的な重水素標識が困難なことからAbul-Hajj²²⁾は臭素あるいはメチル基が置換した基質を用いて検討し、 4α -equatorial水素が脱離すると結論している。しかしながらこれらかさ高い置換基をもつ化合物は微生物変換の立体化学を論じるのに基質として必ずしも適切であるとはいえない。そこで著者はこの目的により適した基質としてepimeric $4-d_1$ - 5α -androstane- $3,17$ -dionesを合成し、*Nocardia restrictus*による脱水素反応を検討した。

第2節 Epimeric $4-d_1$ - 5α -Androstane- $3,17$ -dionesの合成

水酸基のつく炭素の α 位に重水素を立体特異的に導入する方法として二重結合に対するdeuteriodiboraneのcis付加ならびにepoxideの LiAlD_4 によるtrans-diaxial開裂が広く用いられる。³⁴⁾いま d^3 体を中間体に用い、これらの反応を駆使すれば目的とする化合物の合成が可能と思われる。そこでCagliotiら³⁵⁾の方法に準じてdehydroepiandrosteroneより3工程で製した 5α -androst- 3 -en- 17 -one(18)を出発原料に用い、THF中deuterio-borationついでアルカリ性過酸化水素による酸化反応に付した。この際 3α -OH体のはかに 3β -OH体、 4α -OH体も副生し、目的物との分離精製は困難であった。さきにHosodaら³⁶⁾はtert-butyltrimethylsilyl etherへの誘導が水酸基の保護にとどまらず、分離精製の手段としてもしばしば有利なことを認めている。そこでこの反応成績体をN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)中imidazoleの存在下tert-butyltrimethylsilyl chlorideでシリル化し、シリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーに付したところ $4\alpha,17\alpha-d_2$ - 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol bis(tert-butyltrimethylsilyl ether)(19b)が得られた。そこで(19b)をアセトン中5N塩酸で脱シリル化して $4\alpha,17\alpha-d_2$ - 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol(19a)を得、ついでクロム酸-ピリジン試薬を用いる酸化反応に付して目的とする $4\alpha-d_1$ - 5α -androstane- $3,17$ -dione(20)を製した。

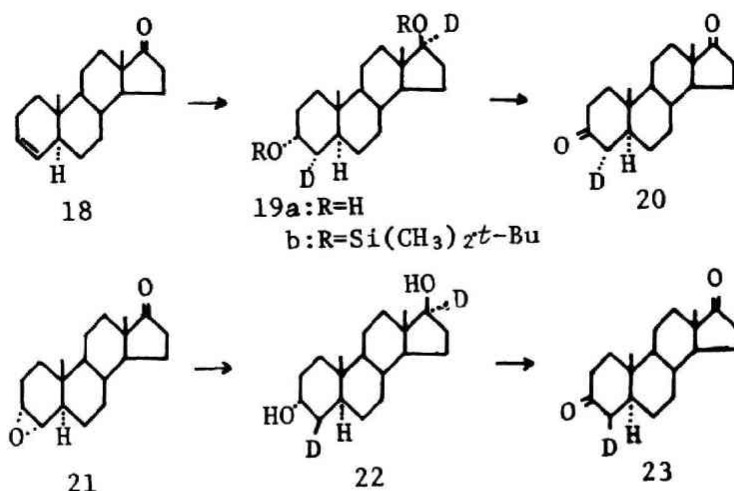


Chart 3

一方第2の目的物である $4\beta-d_1-5\alpha$ -androstane-3,17-dione (23)は $3\alpha, 4\alpha$ -epoxy- 5α -androstane-17-one (21)をTHF中 $LiAlD_4$ で還元して 4β -, $17\alpha-d_2-3\alpha, 17\beta$ -diol (22)としたのち前述と同様にクロム酸-ピリジン試薬で酸化して製した。

以上合成した重水素化合物 (20, 23) はMSの解析から重水素含有率はいずれも95%以上であることが確認された。また、これらは相互に異なるIRスペクトルを示すことから異性体であることが確認された。

第3節 *Nocardia restrictus* のCell-free Extract によるEpimeric

$4-d_1-5\alpha$ -Androstane-3,17-diones の脱水素

Sihら³¹⁾の方法に準じて調製した*Nocardia restrictus* (ATCC14887)のcell-free extractを酵素源に用い、PMSを電子受容体として27°に15hrインキュベートした。インキュベーション混合物を酢酸エチルで抽出しpreparative TLCで精製してandrost-4-ene-3,17-dioneおよびandrost-1,4-diene-3,17-dioneをともに約20%の変換率で得た。ついで変換生成物のMSから標識重水素の保持率を測定しTable IIに示す結果を得た。すなわち $4\alpha-D$ 体(20)を基質としたとき生成する 4^1 体, $4^{1,1}$ 体はいずれも98%と高い重水素保持率を示したのに対し、 $4\beta-D$ 体(23)を基質に用いた場合両生成物共重水素は全く保持されていなかった。さらに保持されている重水素はその位置が4位であることもNMRスペクトルの結果から確認された。

**Table II Deuterium Retention of Products
in Microbial Dehydrogenation**

Product	Substrate(Z)	
	4 α -D(20)	4 β -D(23)
Androsta-1,4-diene-3,17-dione	98	0
Androst-4-ene-3,17-dione	98	0

第 4 節 結 論

5 α -Androstane-3,17-dione が *Nocardia restictus* により脱水素化を受け Δ^4 体を生成するとき 4 β -axial 水素が立体選択的に脱離することが立証されるにいたった。したがってさきに Abul-Hajj が得ている結論²²⁾ はここに訂正されねばならない。今回、著者が得た結果は微生物による脱水素反応がカルボニルの α 位において axial 水素に特異的であるとする従来の知見¹⁰⁻¹³⁾ によく一致している。一般に 3-ketosteroid の微生物による脱水素反応はエノール化の関与が考えられており¹⁰⁻¹³⁾, 5 α -3-ketosteroid の Δ^4 脱水素反応は Fig.3 に示すような機構で進行するものと推測される。

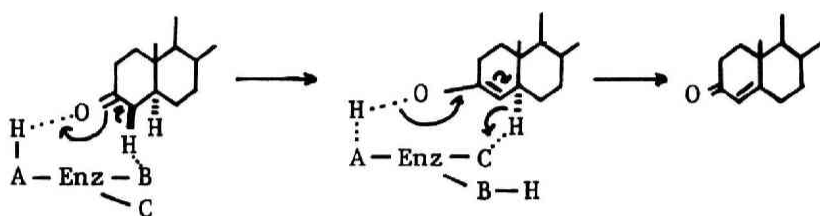


Fig.3 Possible Mechanism for Microbial Dehydrogenation

Enz : Enzyme, A : Proton donor, B : Proton acceptor

C : Hydride acceptor

すなわち 3 位カルボニル基へのプロトンの付加, ついで 4 β -axial 水素の立体選択的脱離によりエノール化が引き起こされて Δ^3 中間体を生じ, さらに 5 α -水素が hydride ion として脱離し Δ^4 -3-keto 体を生成する。

第3章 4^4 -3-ケトステロイドの水素添加機構

第1節 序

Testosterone は 4^4 が飽和化され 5α -dihydrotestosterone に変換をうけたのち男性ホルモン作用を発現する。³⁷⁾ このため二重結合の還元機構について興味をもたれ、数多くの研究がなされている。^{14, 19, 20)} 例えば *in vitro* でラットの肝あるいはこう丸により 5α -および 5β -dihydrotestosterone に変換される際、5 位には補酵素の水素が hydride ion として^{14, 19, 20)}、一方 4 位には medium の水素がプロトンとして¹⁴⁾ 付加することが明らかにされている。この種の還元反応は微生物によっても起ることが知られており、例えばラットの腸内細菌により cholestenone は 5β -cholestan-3-one に変換される。¹⁾ この還元では補酵素 NADH の proR 水素が 5 位に付加することが明らかにされている²¹⁾ が、4 位の水素付加に関しては何ら検討がなされていない。

近年 NMR スペクトルの解析において常磁性金属のランタニド錯体がシフト試薬として有用なことが認められ、種々の応用が試みられている。^{38, 39)} C_{18} , C_{19} ステロイドは一般に 3 位および 17 位に併せて酸素官能基を有するため、シフト試薬を用いる NMR スペクトルの解析が困難である。しかし酸素官能基の一方を *ter*-butyldimethylsilyl 化すると A 環および D 環上のプロトンにもとづくシグナルの解析は容易になる。⁴⁰⁾

飽和化反応は不飽和化反応の機構とも関連して興味をもたれることから、微生物による 4^4 -3-ketosteroid の 4 位水素付加の立体化学を明らかにすることを企てた。そのためまず、 $4-d_1$ -androstenedione を合成し、これを基質として *Penicillium decumens* による変換を行ない、得られる 5α 還元体に保持される重水素の位置を NMR スペクトルにより決定することを試みた。

第2節 $4-d_1$ -Testosterone および $4-d_1$ -Androstenedione の合成⁴¹⁾

第1章、第2章において 5α -および 5β -androstane-3, 17-dione が *Nocardia restrictus* により脱水素化を受け androst-4-ene-3, 17-dione に変換される時、axial 水素が立体選択的に脱離することを明らかにした。それゆえ 4 位を重水素標識した 5α -および 5β -androstane-3, 17-dione を基質に用い *Nocardia restrictus* で変換すれば、 $4-d_1$ -androstenedione の調製は可能である。しかしながら微生物変換はその過程で標識重水素が一部脱離するため、標識純度の高い基質の調製法として満ちしうる方法とはいえない。

一方、化学的な重水素化は重水素化試薬の純度で標識することが可能であり、そのため今まで種々の標識法が開発されてきた。³⁴⁾ ハロゲン化物の金属水素化物による求核置換反応、例えば 19 -bromoandrost-5-en-3 β -ol acetate の $LiAlD_4$ 還元による $19-d_1$ -androst-5-en-

3 β -ol の合成もその一つである。^{42,43)} そこでまず金属水素化物による脱ハロゲン化を利用し重水素の導入を試みた。

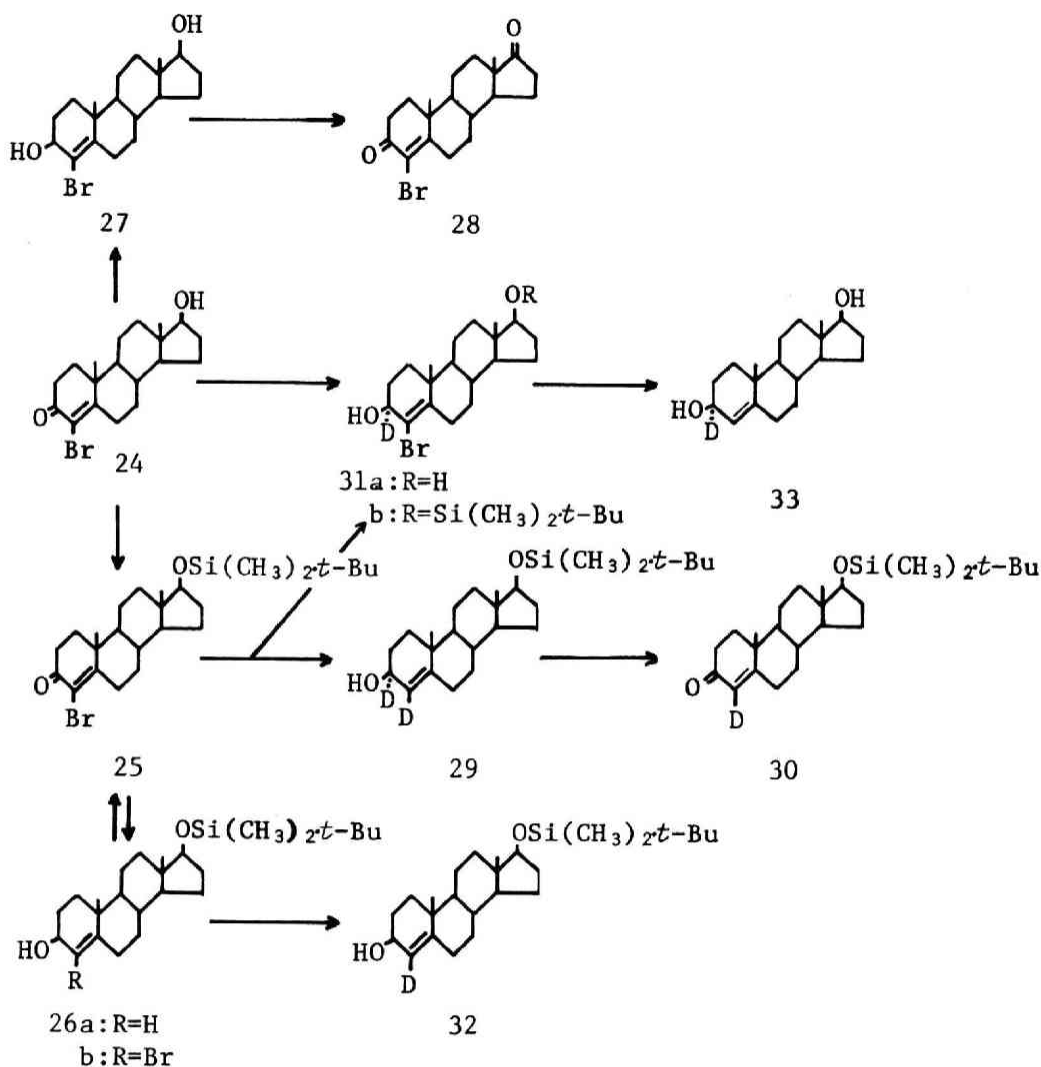


Chart 4

はじめに 4-bromotestosterone (24) を LiAlH_4 還元が付したところ目的とする 3, 17-diol 体の他に 4-ブロム体も副生し、両者の分離が困難であった。そこで分離精製を容易にするため (24) をあらかじめ 17-*tert*-butyldimethylsilyl ether (25) としたのち LiAlH_4 で還元し androst-4-ene-3 β , 17 β -diol 17-monosilyl ether (26a)³⁶⁾ を得た。この結果から重水素化試薬を用いることにより 4 位重水素標識が可能と思われた。そこで (25) を

LiAlD_4 還元付したところ、 $3\alpha, 4\text{-d}_2\text{-androst-4-ene-3}\beta, 17\beta\text{-diol 17-monosilyl-ether (29)}$ と $3\alpha\text{-d}_1\text{-4-bromoandrost-4-ene-3}\beta, 17\beta\text{-diol 17-monosilyl ether (31b)}$ が生成した。(29)の4位における重水素の保持率はクロム酸酸化により得られる $4\text{-d}_1\text{-testosterone 17-silyl ether (30)}$ のMSおよびNMRスペクトルの解析から85%であることが判明した。本反応では大過剰の重水素化試薬を用い、しかも長時間還流したにもかかわらず脱ハロゲン化されない(31b)が相当量単離され、また(30)の重水素保持率も85%と低値であった。そこで(25)をまずlithium tri-*tert*-butoxyaluminum hydrideで4-bromo- $3\beta\text{-hydroxy}$ 体(26b)に還元したのち、 LiAlD_4 による脱ハロゲン化反応に付し $4\text{-d}_1\text{-androst-4-ene-3}\beta, 17\beta\text{-diol 17-monosilyl ether (32)}$ を得た。しかし(32)はMSおよびNMRスペクトルからみて、重水素が70%導入されているに過ぎなかった。この低い重水素保持率は一部3位水素の4位への転移に起因するものと推測されるが、その詳細は今後の検討に俟たねばならない。

そこで(24)をまず LiAlD_4 で還元し $3\alpha\text{-d}_1\text{-4-bromoandrost-4-ene-3}\beta, 17\beta\text{-diol (31a)}$ としたがその構造は(24)の金属水素化物還元により得られた4-bromo- $3\beta\text{-hydroxy}$ 体との比較により確認した。ついで(31a)を LiAlH_4 による脱ハロゲン化反応に付し、 $3\alpha\text{-d}_1\text{-androst-4-ene-3}\beta, 17\beta\text{-diol (33)}$ を得た。MSおよびNMRスペクトルの解析の結果(33)は3 α 位に重水素が完全に保持されており、4位へは転移していないことが明らかとなった。これらの結果から金属水素化物を用いる脱ハロゲンにより4位に重水素を導入する方法は、今回の目的に必要な基質の調製に適切でないことが判明した。そこで標識純度の高い重水素化物を得るため別途合成を検討した。

一般に5 α 系ステロイドにおける4 β -水酸基の脱水反応はregiospecificに進行し 4α 体を与えることが知られている。²³⁾従って4 α 位に重水素を保持した4 $\beta\text{-hydroxy}$ 体を得ることができれば目的を達することができるものと思われる以下の予備実験を行なった。

すなわちtestosteroneより2工程で得られるandrost-4-ene- $3\beta, 17\beta\text{-diol bis (tert-butyl dimethylsilyl) ether (34)}$ を出発原料とし、diboraneによるhydroboration ついでアルカリ性過酸化水素酸化に対して4 $\alpha\text{-hydroxy}$ 体(35b)を得た。(35b)はアセトン中5N塩酸で処理するとき5 $\alpha\text{-androstane-3}\beta, 4\alpha, 17\beta\text{-triol (35a)}$ を与えることからその構造を確認した。ついで(35b)をクロム酸-ピリジン試薬で4-keto体(36)に酸化したのち、 LiAlH_4 で還元し4 $\beta\text{-hydroxy}$ 体(37b)を得た。(37b)は脱シリル化により5 $\alpha\text{-androstane-3}\beta, 4\beta, 17\beta\text{-triol (37a)}$ を与え、さらに(37a)は無水硫酸銅の触媒下アセトンと還流することによりアセトニド(38)を形成することから $3\beta, 4\beta\text{-cis-glycol}$ であることが確認された。ついで(37b)をピリジン中オキソ塩化リンを用いる脱水反応に付したところ期待通り

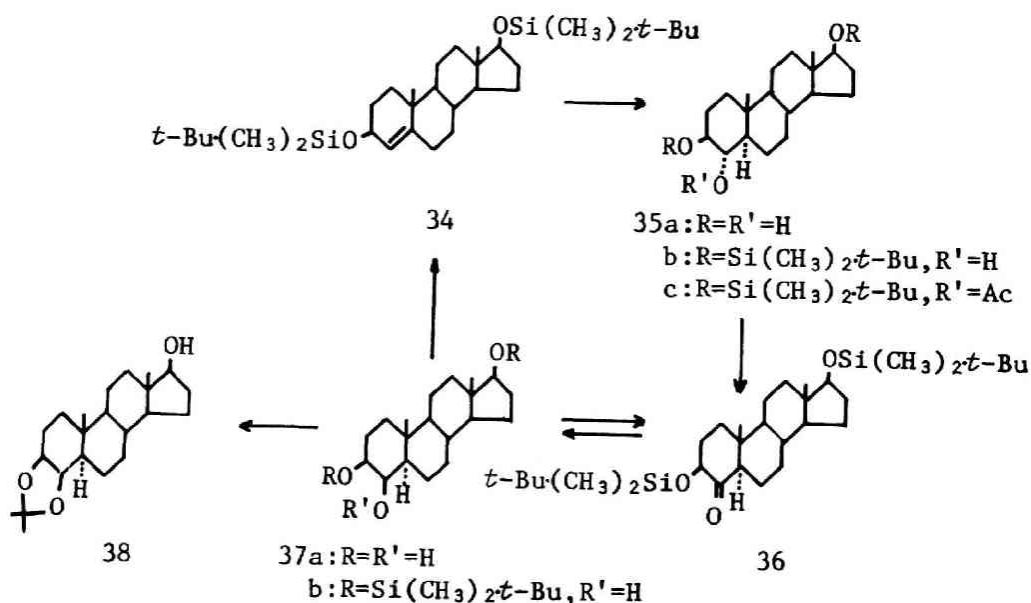


Chart 5

4^{*}体(34)が高収率で得られた。以上の結果4-keto体(36)を原料とし LiAlD_4 を用いることにより testosterone の4位に重水素を導入しうる可能性が明らかとなった。

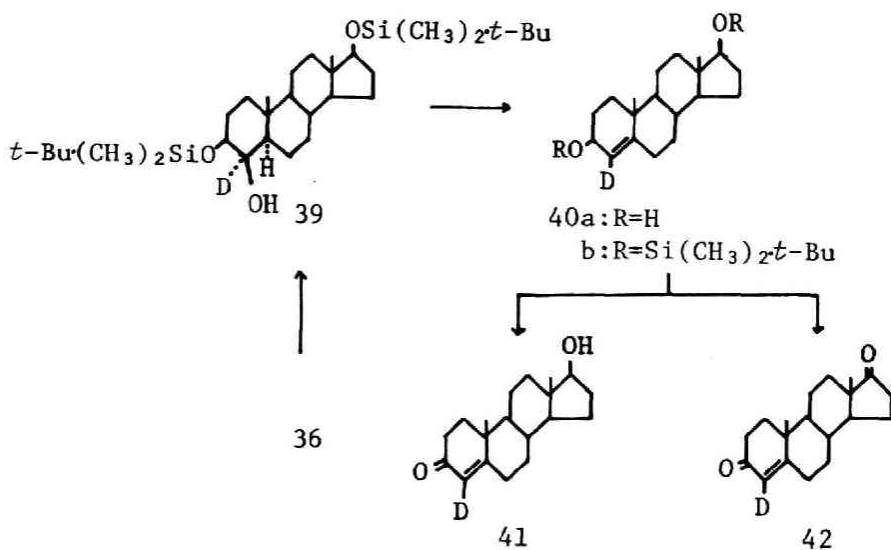


Chart 6

すなわち 4-keto 体 (36) を LiAlD_4 で還元して $4\alpha\text{-d}_1\text{-}4\beta\text{-hydroxy}$ 体 (39) としたのちさきと同様脱水反応に付して $4\text{-d}_1\text{-}4^{\Delta}$ 体 (40b) を得た。一般にシリルエーテルは塩酸で容易に加水分解されるが、(40b) は酸に不安定な allyl 構造であるため THF 中 tetra-*n*-butyl-ammonium fluoride で処理して脱シリル化し、 $3\beta, 17\beta\text{-diol}$ 体 (40a) を得た。ここで目的物の一つである testosterone を得るには 3 位水酸基の選択的酸化を必要とする。Allyl alcohol の選択的酸化剤として二酸化マンガン、*N*-ブロムアセトアミド、dichlorodicyano-benzoquinone (DDQ) などが知られているが²³⁾、(40a) は 4 位に重水素を保持しているため、これらを用いる反応条件では重水素の脱離することが懸念された。そこで (40a) をクロム酸-ピリジン試薬で緩やかな条件下短時間酸化したところ $4\text{-d}_1\text{-testosterone}$ (41) と $4\text{-d}_1\text{-androstenedione}$ (42) が 2 : 1 の量比で生成した。両者は preparative TLC で容易に分離され、MS および NMR スペクトルの解析の結果、ともに 98% の標識純度で 4 位に重水素の保持されていることが確認された。

第 3 節 *Penicillium decumbens* による $4\text{-d}_1\text{-Androstenedione}$ の水素添加⁴⁴⁾

ある種の細菌、放線菌類は $4^{\Delta}\text{-}3\text{-ketosteroid}$ の二重結合を還元し飽和 3-ketosteroid を与えることが知られている。¹⁾ Miller らは testosterone, androstenedione が *Penicillium decumbens* (NRRL 742) により還元され、regiospecific に $5\alpha\text{-}3\text{-keto}$ 体を生成すると報告している。⁴⁵⁾ またこの微生物変換では testosterone より androstenedione の方が基質として有利であるという。そこで $4\text{-d}_1\text{-androstenedione}$ を基質とし *Penicillium decumbens* による変換を行なった。すなわち Miller らの方法に準じ $4\text{-d}_1\text{-androstenedione}$ (42) を

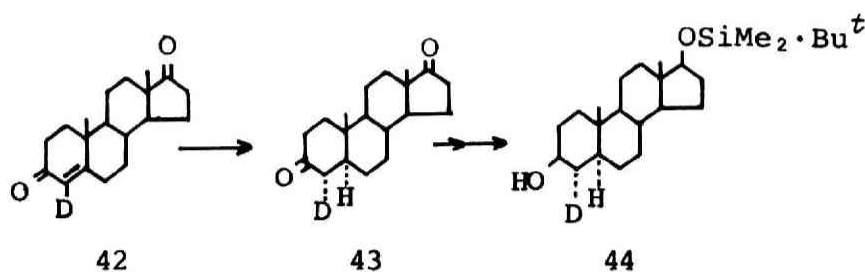


Chart 7

Penicillium decumbens の生育菌系とともに 27° に 74 hr インキュベートした。インキュベーション混合物を酢酸エチルで抽出し、preparative TLC で精製することにより $5\alpha\text{-andro-}$

stane-3, 17-dione (43) を約 80% の収率で得た。(43) の MS を解析した結果, 標識重水素は 92% と高い保持率であったがその位置を明らかにすべくシフト試薬を用い NMR スペクトルを測定した。Fig. 4 は基質と $\text{Eu}(\text{fod})_3$ のモル比 0.57 における非標識の 5 α -androsterane-3, 17-dione ならびに (43) の 2 位および 4 位水素シグナルのスペクトルを示したもの

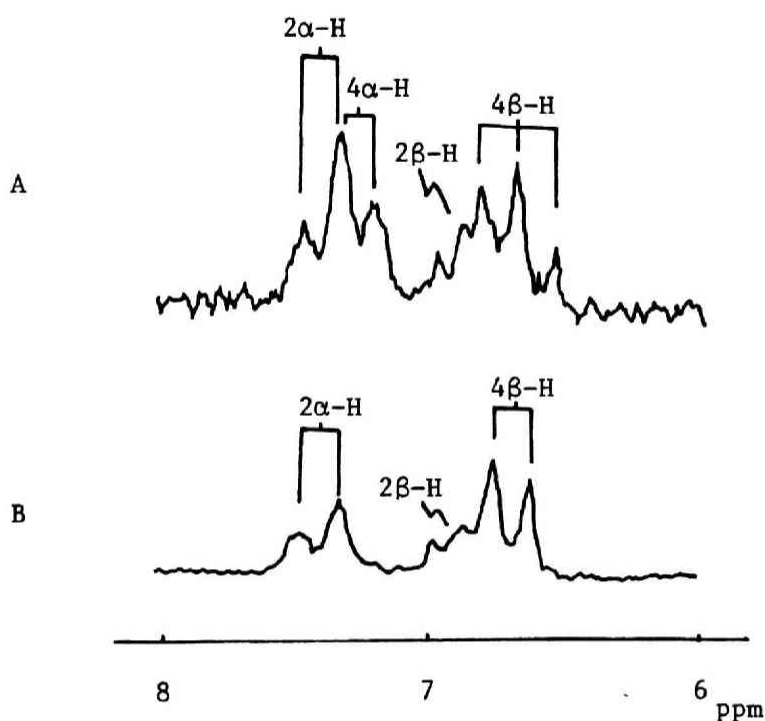


Fig. 4 The ^1H NMR Spectra of (A) 5 α -Androstane-3,17-dione and (B) Microbial Transformation Product (43) with 0.57 Mole Equivalent Each of $\text{Eu}(\text{fod})_3$ in Carbon Tetrachloride at 28°

である。非標識体の各水素シグナルの帰属は epimeric 2-および 4-d₁-5 α -androsterane-3, 17-dione を同一条件下測定して得たデータとの比較により行なった。その結果 7.39, 7.26 ppm にみられる broad doublet ($J=15\text{Hz}$) はそれぞれ 2α , $4\alpha\text{-H}$, 6.9 ppm 付近の multiplet は $2\beta\text{-H}$, さらに 6.66 ppm の triplet ($J=14\text{Hz}$) は $4\beta\text{-H}$ に帰属することができた。一方 (43) のスペクトルでは $4\alpha\text{-H}$ シグナルがほぼ完全に消失しているのに対し $4\beta\text{-H}$ による triplet は doublet ($J=14\text{Hz}$) に変化していた。この結果変換成績体は 4α 位に重水素を保持することが確認された。しかし, この NMR スペクトルにおいて $4\alpha\text{-H}$ シグナルは $2\alpha\text{-H}$ のそれと

一部重なっており、重水素の percentage analysis は困難であった。さらにシフト試薬を加えるなど種々条件を検討したが $4\alpha\text{-H}$ シグナルを分離することはできなかった。

すでに著者は $5\alpha\text{-androstane-}3\beta, 17\beta\text{-diol } 17\text{-tert-butyl dimethylsilyl ether}$ の Eu(dpm)_3 を用いる NMR スペクトルにおいて $4\alpha\text{-H}$ シグナルが他のシグナルと分離して観察されることを見出ししている。⁴⁰⁾ そこで本法を適用することとし、変換成績体 (43) を $5\alpha\text{-androstane-}3\beta, 17\beta\text{-diol } 17\text{-monosilyl ether}$ (44) に誘導した。すなわち (43) を THF 中 LiAlH_4 還元により 3, 17-diol 体としたのち DMF-ピリジン中 imidazole の存在下 *tert*-butyldimethylsilyl chloride でシリル化し、3, 17-disilyl ether を製した。さらに Hosoda ら³⁶⁾ の方法に準じアセトン中 5 N 塩酸で処理し 3 位シリル基を選択的に除去し目的とする (44) を得、ついでシフト試薬を用いその NMR スペクトルを測定した。Fig. 5 は基

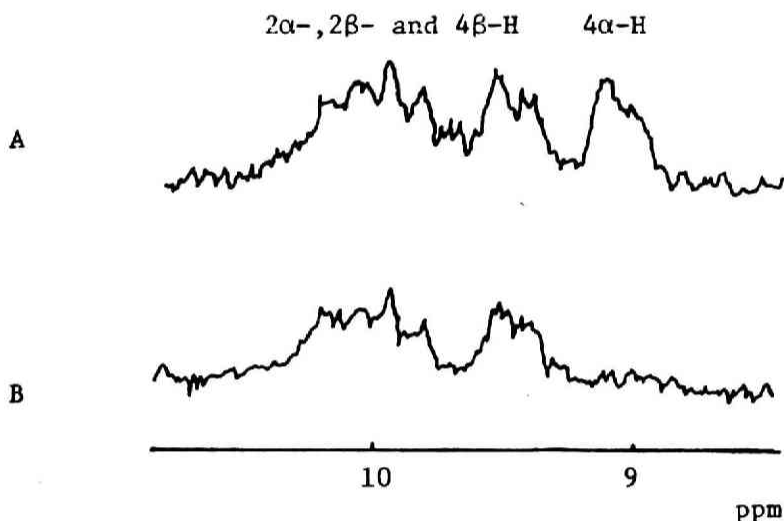


Fig.5 The ^1H NMR Spectra of (A) $5\alpha\text{-Androstane-}3\beta, 17\beta\text{-diol } 17\text{-tert-Butyldimethylsilyl Ether}$ and (B) Compound 44 with 0.56 Mole Equivalent Each of Eu(dpm)_3 in Carbon Tetrachloride at 28°

質と Eu(dpm)_3 のモル比 0.56 における 2-および 4-H シグナルのスペクトルを示したものである。非標識の基質では $4\alpha\text{-H}$ シグナルが 9 ppm 付近に multiplet として他の水素シグナルと明瞭に分離して観察されるのに対し変換生成物の誘導体では対応するシグナルがほぼ 90% 以上消失しており、変換成績体において重水素が専ら 4α 位に保持されていることは明らかである。このことはまた変換成績体の IR スペクトルが別途合成した $4\alpha\text{-d}_1\text{-}5\alpha\text{-androstane-}3, 17\text{-}$

dione (20) のそれと完全に一致することからも支持される。

以上の結果 androstenedione の *Penicillium decumbens* による 5α 還元では 4 位における水素付加が立体選択的に β 側からおこり 5α -androstane-3, 17-dione を生成するものと結論される。

第 4 節 結 論

ラット肝による testosterone の 5α および 5β -dihydro-testosterone への変換では、5 位および 4 位に付加する水素はそれぞれ $\text{NADPH}^{14, 19, 20}$ 、培地¹⁴⁾に由来することが明らかにされている。また最近 Wilton⁴⁶⁾ は 3 位酸素官能基を ^{18}O で標識した testosterone をラット肝とインキュベートし、得られる 5α -および 5β -還元体がいずれも ^{18}O を保持していることから、二重結合の還元はシッフ塩基を経由するルート (Mechanism 1) ではなくエノールを中間体とするルート (Mechanism 2) に沿って進行するものと考えている (Fig. 6)

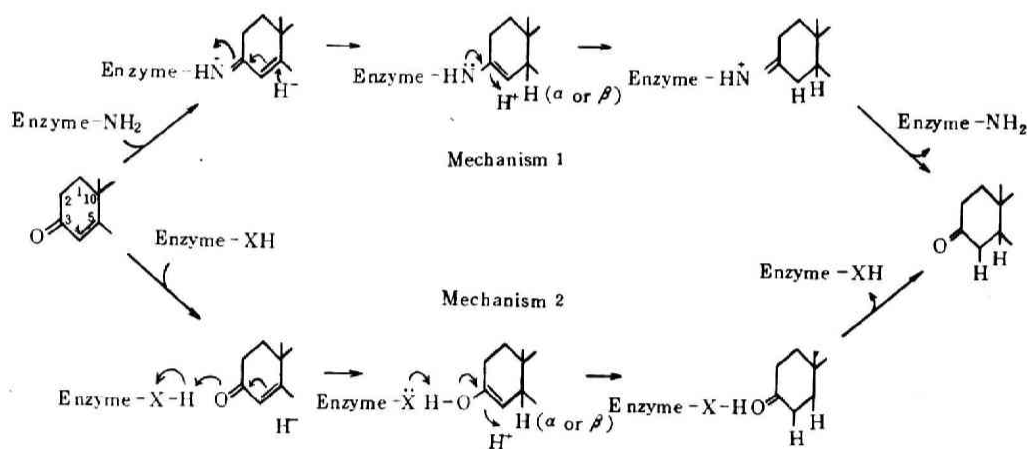


Fig. 6

今回の Δ^4 還元もこの種のエノール中間体を経由すると仮定すれば Fig. 7 に示すような機構が考えられる。すなわち Δ^4 -3-ketosteroid はその 3 位カルボニル基がプロトン付加を受けると同時に 5α 位に hydride ion が付加し、その結果エノール化が引き起こされ、さらに β 側から立

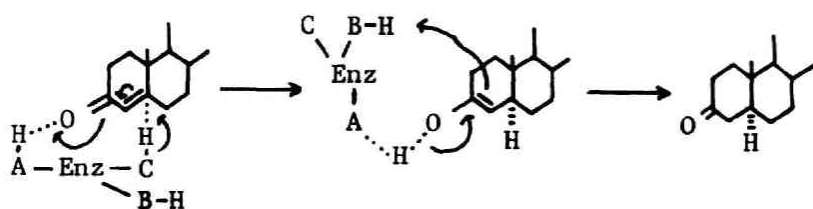


Fig.7 Possible Mechanism for Microbial Hydrogenation

Enz : Enzyme, A : Proton donor, B : Proton donor,

C : Hydride donor

体選択的にプロトンが付加し，5 α -3-ケト体を生成する。この機構において4³-エノール中間体に対する β 側からのプロトン付加が酵素的であるか否かは明らかでないが，エノールの化学的ケトン化が β 側から起こる事実と符号しており，興味深く思われる。また第1章，第2章において微生物による脱水素反応がカルボニルの α 位においてaxial水素に特異的であることを述べたが，今回の4⁴還元機構を考え合わせると両者に共通なエノール中間体の関与が示唆される。

第4章 コレステロールの Androsta-1,4-diene-3,17-dione への変換における脱水素機構

第1節 序

ステロイドホルモン生産の原料的基盤を広げるため、天然に広く分布し、かつ安価に入手し得るステロールの利用が早くから着目されてきたが、ステロイドホルモンへの転換に必要な側鎖の切断が化学的には7~9% (クロム酸化法) と効率が悪く実用化は困難であった。1969年、有馬らは cholesterol がある種のキレート剤の存在下、*Arthrobacter simplex* に代表される放線菌により androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) に効率よく変換されることを見いだした。⁴⁷⁾ さらにこの代謝経路についても検討し、cholesterol はまずその3位水酸基が酸化をうけて cholestenone となり、さらにC₁, C₂間の不飽和化が起こり、ついで側鎖がC₁₇位で切断されてADDを生成することを明らかにしている。⁴⁸⁾ しかしながらこの代謝過程におけるA環不飽和化の機構については何ら検討がなされていない。著者はさきに3-ketosteroidの微生物によるA環脱水素の立体化学について検討を行ってきたが、これらとの関連上興味をもたれることから、cholesterol のADDへの変換反応をとり上げ、2位および4位からの水素脱離の立体化学を明らかにすることを試みた。まず、epimeric 2-および4-d₁-cholesterols を合成し、これらを基質として*Arthrobacter simplex* による変換を行ない、生成するADDの重水素保持率を測定して水素脱離の立体選択性を検討した。

第2節 Epimeric 2-および4-d₁-Cholesterols の合成⁴⁹⁾

Cholesterol の4位を立体特異的に重水素標識する方法についてはすでにBartonら⁵⁰⁾ の報告がある。すなわち、まずcholesteryl benzoateを二酸化セレン酸化に付し、得られる4β-hydroxy体を塩化チオニルで脱水して6β-chlorocholest-5-en-3β-ol benzoateとしたのちLiAlD₄で還元し、4β-d₁-cholesterolを合成している。一方、4α重水素化体は先の4β-hydroxy体を4-keto体に酸化したのち、重水素化ホウ素ナトリウムで還元して4α-d₁-cholest-5-ene-3β,4β-diol 3-benzoateに導き、これを塩化チオニル処理、ついでLiAlH₄還元に付して得ている。またSegalら⁵¹⁾ は3-acetoxycholesta-3,5-dieneをNaBH₄で処理したのち重酢酸で分解して4β-d₁-cholesterolを合成している。しかしながら、これらはいずれも立体特異性、収率の点で満足し得るものではなく、またC-2水素の重水素化については何ら検討がなされていない。さきに著者は二重結合のB₂D₆によるdeuterioboration, epoxideのLiAlD₄によるtrans-diaxial開裂を利用し、5α-および5β-androstane-3,17-dione

の2位および4位を立体特異的に重水素標識することに成功した。そこで Δ^2 ならびに Δ^3 体に対しこれらの反応を駆使すれば、一層有利に目的を達成することができると考え、 Δ^2 -および Δ^3 -5 α -cholestan-5-olと対応するepoxy体を合成し、cholesterolへの誘導を試みた。

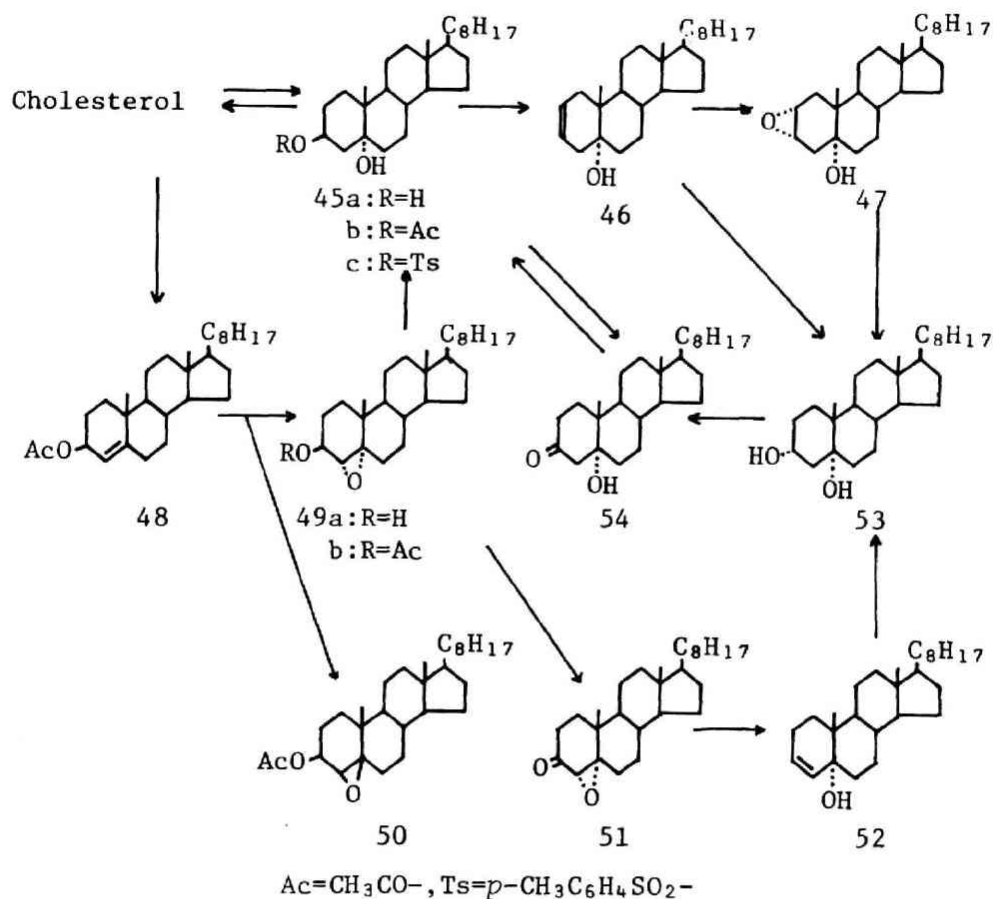


Chart 8

まず2位への重水素導入のため予試験を行なった。すなわち、cholesterolより3工程を経て製した5 α -cholestane-3 β , 5-diol 3-tosylate (45c)をアルミナに一夜吸着させて脱tosyl化し、高収率で5 α -cholest-2-en-5-ol (46)を得た。ついで(46)をm-クロル過安息香酸でエポキシ化したところ2 α , 3 α -epoxide (47)がほぼ単一の成績体として得られた。(47)はそのNMRスペクトルにおいてエポキシ基の根元のプロトンにもとづく吸収が3.38 ppmに2H分のmultipletとして観察されることから2 α , 3 α -epoxideであることが確認された。そこで(46)のcholesterolへの誘導を試みた。

まず Δ^2 体 (46) を原料とし hydroboration, ついでアルカリ性過酸化水素酸化に付したのち反応生成物を preparative TLC で精製し, 主生成体として 5α -cholestane- 3α , 5 -diol (53) を得た。(53) は NMR スペクトルにおいて 3 位水酸基の根元のプロトンが 4.0 ppm に $W_{1/2} = 6\text{ Hz}$ の multiplet として観察されることから 3α , 5α -dihydroxy 体と推測されたが, さらに 3-keto 体 (54) に誘導し, それが 3β , 5α -dihydroxy 体 (45a) の酸化生成体と完全に一致することからその構造を確認した。つぎに 2α , 3α -epoxide (47) を無水 THF 中 LiAlH_4 還元付したところ 3α , 5α -dihydroxy 体 (53) が単一生成物として得られた。この結果 5α 系ステロイドにおいて diborane は Δ^2 に対し α 側より攻撃し, 一方 LiAlH_4 は 2α , 3α -epoxide を *trans*-di-axial 開裂して共に α -axial-hydroxy 体を生成することが明らかとなった。そこでひきつづき (53) の cholesterol への誘導を行なった。すなわち (53) をクロム酸酸化により 3-keto 体 (54) としたのちメタノール中 NaBH_4 で還元し 3β -hydroxy 体 (45a) と少量の 3α -hydroxy 体 (53) を得た。(45a) を常法通り 3-acetate (45b) としたのち, 塩化チオニルによる脱水, ついでアルカリ加水分解に付し, cholest-4-en- 3β -ol, cholest-5-en- 3β -ol を約 1 : 2 の量比で得た。つぎに 4 位への重水素導入に必要な Δ^3 体 (52) の合成を行なった。

すなわち cholesterol より 3 工程を経て製した cholest-4-en- 3β -ol acetate (48) を *m*-クロル過安息香酸でエポキシ化し, 4α , 5α -epoxide (49b) と少量の 4β , 5β -epoxide (50) を得た。ついで (49b) をアルカリ加水分解に付し 3β -hydroxy 体 (49a) としたのち, クロム酸-ピリジン試薬で酸化して 4α , 5α -epoxy-3-ketone (51) に誘導した。さらに (51) をヒドラジンヒドラートを用いる Huang-Minlon 反応に付し Δ^3 - 5α -ol (52) を高収率で得た。(52) は NMR スペクトルにおいて 3 位および 4 位の水素によるシグナルが 5.60 ppm に broad singlet として観察されることから 5α -cholest-3-en-5-ol と決定した。(52) および (49b) をそれぞれさきと同様 hydration 反応, LiAlH_4 還元付したところ 3α -hydroxy 体 (53), 3β -hydroxy 体 (45a) が生成し, この結果 4 位へも 2 位の場合と同様立体特異的に重水素を導入する見通しが得られた。そこでひきつづき重水素化試薬を用いて同様の反応を行なった。

まず Δ^2 体 (46) を無水 THF 中三フッ化ホウ素と LiAlD_4 で調製した B_2D_6 ガスを用いて deuterio-boration, さらにアルカリ性過酸化水素で酸化して 2α - d_1 - 3α , 5α -diol (55) を得た。ついで (55) を予試験の場合と同様, クロム酸酸化, NaBH_4 還元付し 2α - d_1 - 3β , 5α -diol (56) に誘導した。さらに (56) をアセチル化, 塩化チオニルによる脱水, アルカリ水解に順次付し, 2α - d_1 -cholesterol (57) を合成した。一方, 2β - d_1 -cholesterol (60) は 2α , 3α -epoxide (47) の LiAlD_4 還元により得られる 2β - d_1 - 3α , 5α -diol (58) を 2α -D 体の場合と同様に処理して製した。また, 4α -D 体 (63) および 4β -D 体 (65) はそれぞれ (52) および (49b) を deuteration, LiAlD_4 還元付し, 生成した 4α - d_1 - 3α , 5α -diol

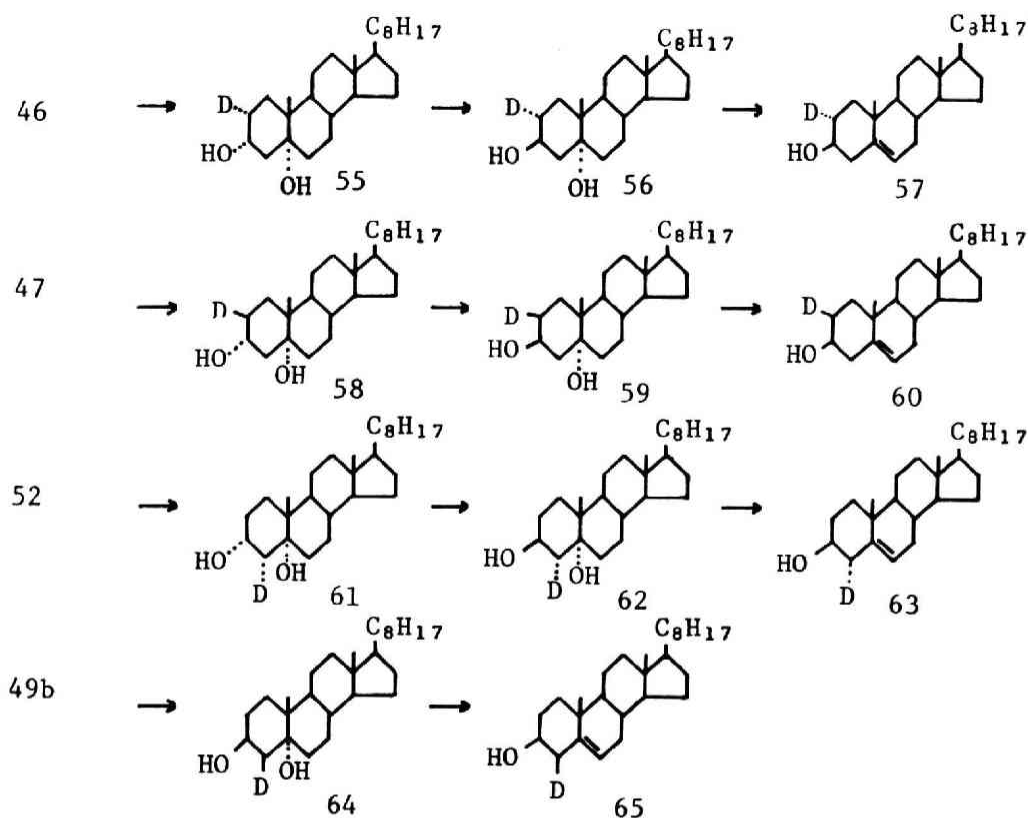


Chart 9

(61) および 4β - d_1 - 3β , 5α -diol (64) をさきと同様に処理して得た。

以上合成した重水素化 cholesterol は MS の解析から、その標識純度が 93~98% であることが判明し、また IR スペクトルにおいても相互に異性体であることが確認された。

第3節 *Arthrobacter simplex* による 2-および 4- d_1 -Cholesterols の変換⁵²⁾

さきに合成した 2-および 4- d_1 -cholesterols (57, 60, 63, および 65) を基質に用い微生物による androst-1, 4-diene-3, 17-dione への変換における C-2 および C-4 水素脱離の立体化学を検討した。すなわち各基質を有馬ら⁴⁸⁾の方法に準じ α , α' -dipyridyl の存在下 *Arthrobacter simplex* と 30° に 74 hr インキュベートした。インキュベーション混合物の酢酸エチル抽出物を preparative TLC で精製し、A/D を 27% の変換率で得た。これら生成物の MS から重水素の保持率をもとめ、Table III に示す結果を得た。すなわち 2α -D 体および 4α -D 体を基質とした場合それぞれ 75%, 80% の重水素保持がみられたのに対し、 2β -D 体、 4β -D 体の変換成績体では標識重水素は完全に脱離していた。

Table III Results of Deuterium Retention

Product	Substrate (%)			
	2 α -D(57)	2 β -D(60)	4 α -D(63)	4 β -D(65)
Androsta-1,4-diene-3,17-dione	75	0	80	0

この結果 *Arthrobacter simplex* により cholesterol が ADD へ変換される際、2 位、4 位、ともに β 位の水素が立体選択的に脱離することが明らかとなった。

第 4 節 結 論

Arthrobacter simplex による cholesterol の代謝についてはすでに序論で述べた経路が示唆されており、今回著者が得た結果から A 環脱水素の機構はつぎのように推測される。すなわち cholesterol はまずその 3 位水酸基が酸化され Δ^3 -3-keto 体に変換されたのち、4 β -水素が立体選択的に引き抜かれ Δ^4 -3-keto 体となり、ついで 2 β -水素が脱離して ADD を生成する。この機構における C-2 位水素の脱離は *Bacillus sphaericus* による androst-4-ene-3, 17-dione の $\Delta^{1,4}$ 体への変換の際、2 β -水素が立体選択的に脱離するという Ringold ら¹³⁾の結果とよく一致する。また最近 Phillips ら⁵³⁾も *Mycobacterium phlei* による cholesterol の ADD への変換の際 2 β -水素が脱離するという知見を得ており、著者の結果をよく支持する。

一方、C-4 水素脱離の結果は Δ^5 -3-ketosteroid が in vitro でウシ副腎、ラット肝において Δ^4 -3-keto 体へ変換される際 4 β -水素が立体選択的に脱離するという従来⁵⁴⁻⁵⁶⁾の知見とよく符号する。しかしながら Ringold ら⁵⁹⁾は *Pseudomonas testosteronei* による変換では 4 β -水素が 6 β 位へ立体特異的に転移すると報告しており、さらに詳細な検討が必要である。

第5章 Cholesterol の Cholestenone への変換における $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ 異性化の機構

第1節 序

ステロイドホルモンの生合成上、 $\Delta^5-3\beta$ -hydroxy 体の Δ^4-3 -keto 体への変換はとりわけ重要な位置を占めている。著者はこれまでステロイドの微生物による脱水素、水素添加反応の立体化学について検討を行ってきた。今回、これらとの関連から微生物による Δ^5 の Δ^4 への異性化における C-4 水素の挙動について検討を加えた。

すでに Ringold ら⁵⁹⁾は 4β - d_1 -androsterone-3, 17-dione を *Pseudomonas testosteroni* 由来の Δ^5-3 -ketosteroid isomerase とインキュベートし、生成する Δ^4-3 -ketosteroid が 6β 位に重水素を保持することを認め、この $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ 異性化反応では 4β 位の水素が立体特異的に 6β 位へ転移すると結論している。しかしながらこの場合、転移した 6β 位の重水素保持率は 50% と低く、さらに 4α 標識体を用いて検討がなされていないなど完全に証明されたとはいえない。

最近、生体成分の定量に微生物由来の酵素を利用する方法が種々開発されている。*Brevibacterium sterolicum* から単離された 3β -hydroxysteroid oxidase [E.C.1. 1. 3. 6] (cholesterol oxidase) は cholesterol を cholestenone に収率よく変換することから血中 cholesterol の定量に応用されている。^{60, 61)} そこで 3β -hydroxysteroid oxidase による cholesterol の cholestenone への変換に伴う二重結合異性化の立体化学について検討を加えた。

まず、変換成績体が保持する重水素の位置を IR スペクトルにより決定するため標品として epimeric $6-d_1$ -cholestenones を合成した。ついで epimeric 4α -および $6\beta-d_1$ -cholesterols を 3β -hydroxysteroid oxidase とインキュベートし、生成した cholestenone の重水素保持率ならびにその位置を機器データにもとづいて決定した。

第2節 Epimeric $6-d_1$ -Cholestenones の合成⁶²⁾

さきに Jacquesy ら⁶³⁾は二重結合に対する付加反応の立体特異性を知る目的で $6-d_1$ -cholesterol とフッ素化水素との反応を検討し、このとき得られる $6\beta-d_1-5\alpha$ -fluorocholestan- 3β -ol を 3 -keto 体に酸化したのちメタノール中酢酸ナトリウムで処理して $6\beta-d_1$ -cholestenone を製している。また、Ringold ら⁶⁴⁾は酸触媒を用いるエノールのケトン化におけるプロトン付加の立体特異性を明らかにするため 3 -ethoxycholesta- $3, 5$ -diene を重水- $diglyme$

中重酢酸で処理し 6β - d_1 -cholestenone を得ている。しかしながらこれらは収率および標識重水素の立体特異性において不満であり、しかも epimer の 6α -D 体については何ら検討がなされていない。一般に 5α -hydroxy-3-ketosteroid の酸による脱水反応は regiospecific に進行して Δ^4 -3-ketosteroid を⁵⁶⁾、また 5α , 6α -epoxide の LiAlH_4 による還元的開裂は立体特異的に 5α -hydroxy 体を与える²⁴⁾ことが知られている。そこでこれらの反応を駆使して目的物を合成することを企てた。

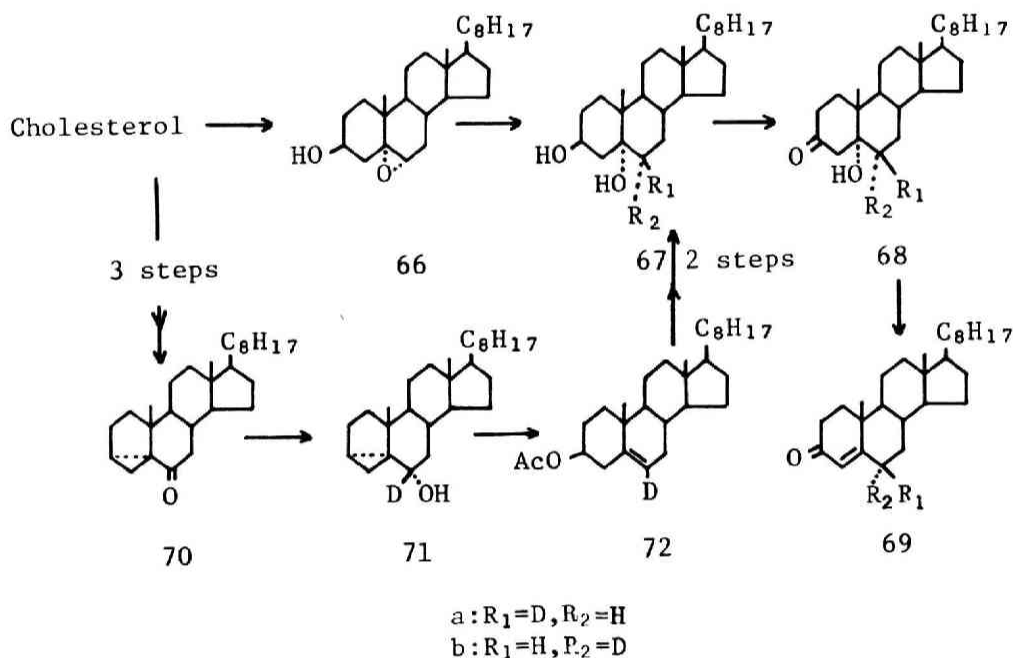


Chart 10

すなわち cholesterol より容易に得られる $5, 6\alpha$ -epoxy- 5α -cholestan- 3β -ol (66) を LiAlD_4 で還元的に開裂して 6β - d_1 - 3β , 5α -diol (67a) としたのち、クロム酸で酸化して 3-keto 体 (68a) を製した。ついで (68a) を無水 P-トルエンスルホン酸を用いる脱水反応に付し 6β - d_1 -cholestenone (69a) を得た。

一方、 6α -D 体の合成は 6 - d_1 -cholesteryl acetate (72) を中間体とするルートが有利に思われたのでまず (72) の合成を行なった。すなわち cholesterol より 3 工程で得られる 3α , 5 -cyclo- 5α -cholestan-6-one (70) を LiAlD_4 で還元し 6β - d_1 - 6α -hydroxy 体

(71)を単一物として得た。ついで(71)を無水エーテル中三フッ化ホウ素の存在下酢酸で処理し中間体の $\Delta^5-3\beta$ -ol acetate (72)を製した。(72)はNMRスペクトルにおいて6位水素シグナルが完全に消失していることから6位の重水素標識が支持された。そこで(72)を 6β -D体の場合と同様 Δ^4-3 -keto体に誘導した。すなわち(72)をm-クロル過安息香酸によるエポキシ化, LiAlH_4 による還元に付したのち, カラムクロマトグラフィーで精製し $6\alpha-d_1-3\beta$, 5α -diol (67b)を得た。さらに(67b)をクロム酸で酸化, ついで無水P-トルエンスルホン酸で脱水し $6\alpha-d_1$ -cholestenone (69b)を製した。

(69a), (69b)および非標識cholestenoneはIRスペクトルにおいて相互に異なるスペクトルを与え, またMSの解析の結果 d_1 標識体が98%を占めることが明らかとなった。さらにNMRスペクトルにおいて(69a)の4位水素シグナルは 5.70 ppm に $W^{1/2} = 2\text{ Hz}$ の鋭いsingletとしてみられたのに対し(69b)ではdoublet ($J = 1.5\text{ Hz}$)として観察された。一般に Δ^4-3 -ketosteroidのNMRスペクトルにおいて4位水素シグナルは 6β -置換体では $W^{1/2} = 2\text{ Hz}$ の鋭いsingletとして, 一方 6α -置換体では $J = 1.5 \sim 2\text{ Hz}$ のdoubletとして観察されることが知られており³³⁾, このことは(69a), (69b)がそれぞれ 6β -D, 6α -D体であることを支持する。

第3節 3β -Hydroxysteroid Oxidase によるEpimeric 4- および 6- d_1 -Cholesterols の変換⁶⁷⁾

$\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ 異性化における水素転移の立体化学を明らかにする目的で 4α -, 4β -, および $6-d_1$ -cholesterolsを基質とし 3β -hydroxysteroid oxidaseによるcholestenoneへの変換を試みた。これら基質のうち $4\beta-d_1$ -cholesterolは第4章において合成したものを, また $6-d_1$ -cholesterolは前節で得た $6-d_1$ -cholesteryl acetate (72)のアルカリ水解によって製した。一方, $4\alpha-d_1$ -cholesterolは従来の方法に収率上難点があるため今回新たに合成を試みた。

一般に Δ^4 に対するエポキシ化反応は α -epoxideと β -epoxideの混合物を与えるが 3β 位水素酸基をアセチル基などで保護すると α -epoxideが主成物となる。²⁴⁾ また 4α , 5α -epoxideの LiAlH_4 還元は 5α -hydroxy体を単一成績体として与え, さらにそれを脱水反応に付すと Δ^4 体と Δ^5 体の混合物を生成することが知られている。²⁴⁾ ところで著者はすでに第3章において $4-d_1$ -androsten-4-ene- 3β , 17β -diol bis(*tert*-butyldimethylsilyl) ether (39)の合成に成功している。それ故4位に重水素を保持した Δ^4 体を用い, これらの反応を駆使すれば目的物の合成が可能と思われる。そこでまず重要な中間体となる $4-d_1$ -cholest-4-en- 3β -ol *tert*-butyldimethylsilyl ether (74b)を得るため予試験を行なった。

すなわちcholest-4-en- 3β -ol *tert*-butyldimethylsilyl ether (74a)を出発原料とし, diboraneによるhydroborationついでアルカリ性過酸化水素酸化に付して 3β , 4α -

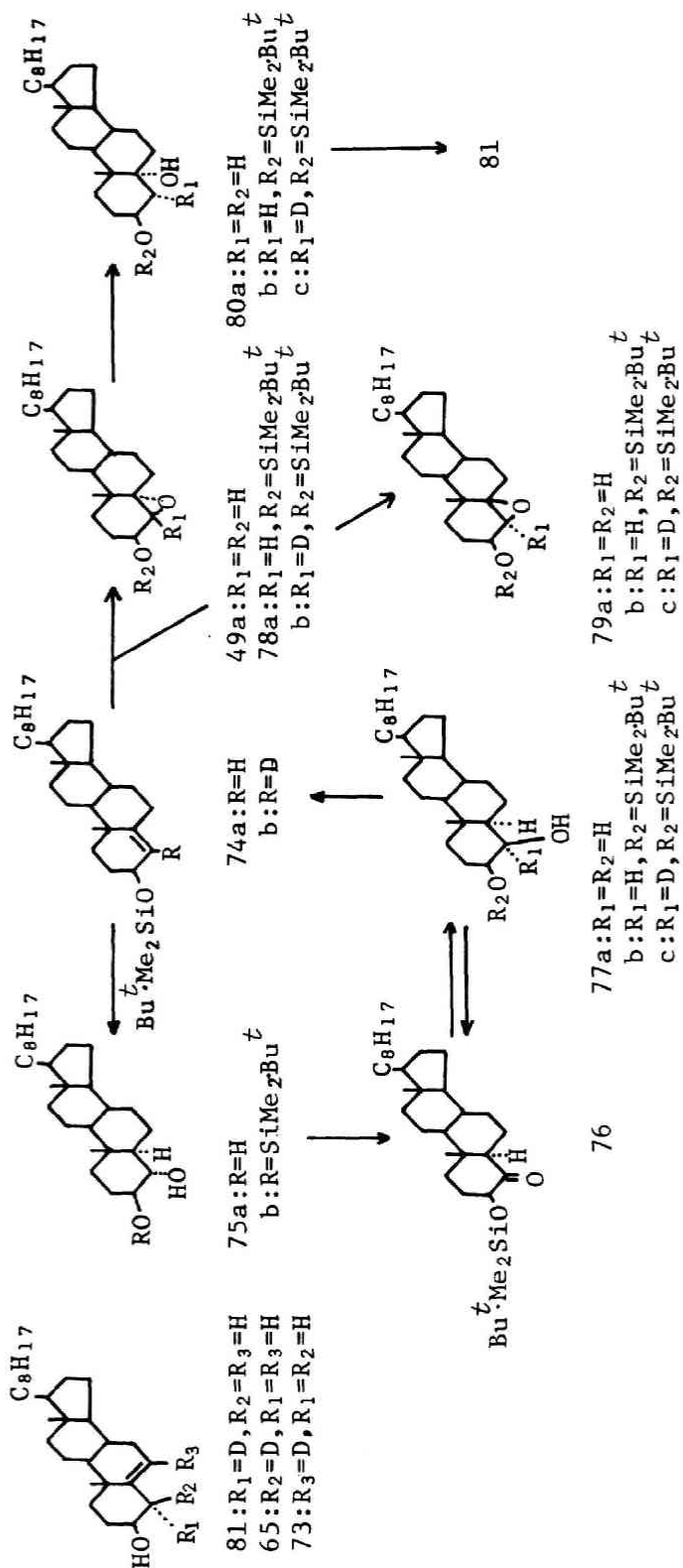


Chart 11

diol 3-monosilyl ether (75b)を得た。(75b)は酸水解に付すとき3 β , 4 α -diol (75a)が得られることからその構造が確認された。ついで(75b)をpyridinium chlorochromateで酸化したところ4-keto体(76)が単一成績体として得られた。(76)はNMRスペクトルにおいて3 α -水素シグナルがJ = 7, 10.5 Hzのdoublet of doubletsとして、また19-メチルシグナルが0.71 ppmにsingleとして観察されることからその構造を決定した。さらに(76)をLiAlH₄還元に付したところ4 β -hydroxy体(77b)を収率よく与えた。(77b)はクロム酸酸化により再び4-keto体(76)を生成するとともに酸加水分解により3 β , 4 β -diol (77a)を与えることからその構造を確認した。ついで(77b)をピリジン中オキシ塩化リンで脱水したところ収率よく4 Δ^4 体(74a)を生成し、この結果4位重水素化の見通しが得られた。そこでひきつづき重水素化試薬を用いて反応を行なった。

まず、さきの4-keto体(76)をLiAlD₄還元に付したがこのとき一部3位シリル基の脱離が認められたため再度シリル化し4 α -d₁-5 α -cholestane-3 β , 4 β -diol 3-monosilyl ether (77c)としたのち前述同様ピリジン中オキシ塩化リンで脱水して4-d₁-cholest-4-en-3 β -ol tert-butyldimethylsilyl ether (74b)を製した。(74b)はNMRスペクトルにおいて対応する非標識体で観察された4位水素のシグナルが完全に消失していることから、その重水素の標識位置が4位であることを確認した。以上の結果中間体となる4-d₁-cholest-4-en-3 β -ol tert-butyldimethylsilyl ether (74b)を得ることができたのでひきつづきcholesterolへの誘導を行なった。

すなわち(74b)をm-クロル過安息香酸でエポキシ化し、4 α -5 α -epoxide (78c)と少量の4 β , 5 β -epoxide (79c)を得た。ついで(78c)をLiAlH₄還元により4 α -d₁-5 α -hydroxy体(80c)としたのちピリジン中塩化チオニルで脱水し4 Δ^4 体と4 Δ^5 体の混合物を得た。この混合物をそのまま塩酸で処理し4 Δ^4 体を4 $\Delta^{4,6}$ 体に変換したのちカラムクロマトグラフィーで精製し4 α -d₁-cholesterol (81)を製した。これら重水素化cholesterols (85, 65および73)はマススペクトルおよびシフト試薬を用いるNMRスペクトルの解析から、それぞれC-4, C-6に重水素が立体特異的に標識されていることが確認された。

そこでこれらを基質としてUwajimaら^{68, 69)}の方法に準じ3 β -hydroxysteroid oxidaseとインキュベートした。インキュベーション混合物を酢酸エチルで抽出、preparative TLCで精製し約95%の収率でcholestenoneを単離した。さらにこれら変換成績体のMSを解析しTable IVに示す結果を得た。

すなわち4 α -D体ならびに6-D体を基質とした場合生成したcholestenoneはいずれも98%と高い重水素保持率を示したのに対し、4 β -D体を用いたとき生成物の重水素保持率は51%

Table IV Results of Deuterium Retention

Product	Substrate (%)		
	4 α -D(81)	4 β -D (65)	6-D (73)
Cholestenone	98	51	98

であった。

ついでこれら変換成績体のNMRスペクトルを測定し4位水素シグナルの解析を行なったところ、4 α -D体からの生成物ではそれがほぼ完全に消失しているのに対し、4 β -D体および6-D体由来する成績体ではいずれも1H分のシグナルが観察された。またそのシグナルは4 β -D体では鋭いsigletに、一方6-D体ではJ=2Hzのdoubletとしてみられた。この結果4 α -D体からの生成物は標識重水素を4位に保持することが明らかとなった。また、6-D体からの生成物も6 α 位にそのまま重水素を保持していると思われたが、事実標品の6 α -d₁-cholestenoneとIRスペクトルが完全に一致することから確認された。一方、4 β -D体を基質とした場合ではさきのNMRスペクトルからその重水素は6 β 位に転移しているものと推測された。そこで6 β -d₁-cholestenoneと非標識cholestenoneの1:1混合物を調製しIRスペクトルを比較検討したところ両者は完全に一致し、重水素は6 β 位に転移していることが立証された。

しかし、この変換において標識重水素は約50%が脱離していることから、この点を確認するためさらに以下の実験を行なった。すなわち非標識cholestenoneおよび6 β -d₁-cholestenoneをD₂OあるいはH₂O中で3 β -hydroxysteroid oxidaseと共に37°で21hrインキュベートした。一方、対照実験として酵素を加えず非標識cholestenoneならびに6 β -d₁-cholestenoneをそれぞれD₂OあるいはH₂O中でインキュベートした。インキュベーション混合物をさきと同様に処理してcholestenoneを得、そのMSおよびNMRスペクトルの解析を行なったのち、調製した標品とIRスペクトルを比較した。

その結果酵素の存在下では6 β -d₁-cholestenoneは標識重水素が28%脱離し、一方非標識cholestenoneは重水中でのインキュベーションにより6 β 位に41%の重水素のとり

Table V Results of Deuterium Exchange between Cholestenone
and Incubation Medium

Substrate	Condition	Deuterium content (%)
6 β -D	Enzyme control in H ₂ O	72
Non-D	Enzyme control in D ₂ O	41
6 β -D	Nonenzyme control in H ₂ O	98
Non-D	Nonenzyme control in D ₂ O	0

こみがみられた。しかしながら酵素を添加しない対照実験では 6 β -d₁-cholestenone ならびに非標識 cholestenone をそれぞれ H₂O, D₂O 中で処理しても重水素の脱離, とりこみは認められなかった。これらの実験結果からみてさきの 4 β -d₁-cholesterol の変換における標識重水素の喪失は生成した cholestenone から二次的な脱離に一部起因すると考えられる。しかし, 転移過程における脱離の可能性も完全には否定し難い。

以上の事実から cholesterol が 3 β -hydroxysteroid oxidase により cholestenone へ変換される際, 4 β 位水素が立体特異的に 6 β 位へ転移すること, またこの時生成する cholestenone の 6 β 位水素は一部酵素的に脱離することが明らかとなった。

第 4 節 結 論

一般に Δ^5 -3 β -hydroxysteroid の Δ^4 -3-ketosteroid への酵素的変換においては Δ^5 -3-ketosteroid を中間体とすることが知られている。また Ringold ら⁵⁰⁾ は 4 β -d₁-androst-5-ene-3, 17-dione を *Pseudomonas testosteroni* の Δ^5 -3-ketosteroid isomerase とインキュベートし, そのとき生成する androst-4-ene-3, 17-dione が 6 β 位に重水素を保持することからその中間体として $\Delta^{3,5}$ -dienol の関与を示唆している。これらの知見と今回の著者が得た結果を考え合わせると cholesterol の cholestenone への変換は Fig. 8 に示すような機構で進行するものと推測される。

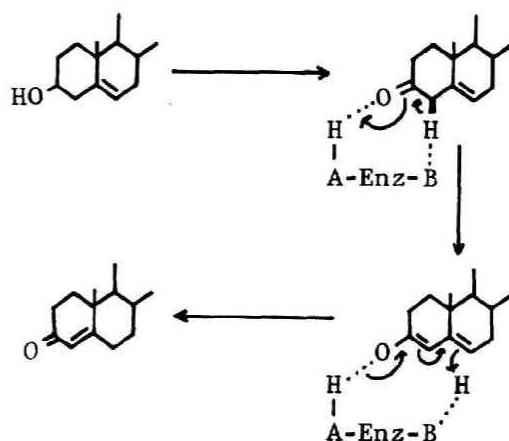


Fig. 8 Possible Mechanism for Microbial Isomerization

Enz : Enzyme, A : Proton donor, B: Proton acceptor

すなわち cholesterol はその 3 位水酸基が酸化され Δ^5 -3-keto 体となったのち 4 β 位水素が立体選択的にひき抜かれて $\Delta^{3,5}$ -dienol 中間体を生じ、さらにその水素が 6 β 位に付加して Δ^4 -3-keto 体を生成する。

謝 辞

本研究に際し終始御指導、御鞭撻を賜った東北大学教授南原利夫先生に謹んで感謝致します。さらに本研究に御協力下さった東北大学薬学部薬品分析化学教室の諸氏、元素分析、核磁気共鳴、ならびに質量スペクトル測定の労をとられた東北大学薬学部中央分析室の諸氏に御礼申し上げます。

また種々菌株を分譲していただいた科薬抗生物質研究所、盛進製薬株式会社、cholesterol oxidase を提供して下さいった協和醗酵工業株式会社に感謝致します。

実 験 の 部

融点は柳本微量融点測定法装置を使用し、未補正、旋光度は特記しないかぎり CHCl_3 溶液で日本分光 Model DIP-SL automatic polarimeter を、IR スペクトルは日本分光 Model IR-S および IRA-I spectrometer を用いて測定した。NMR スペクトルは $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ を内部標準とし、日立 Model R-20 および日本電子 Model SP-100 spectrometer を用いて測定した。また略号として s=singlet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet, dd=doublet of doublets, を用いた。ママスペクトルは日立 Model RMU-7 および RMU-6 E spectrometer, 島津 Model LKB-9000 S を用いて測定した。Preparative TLC には silica gel H, G および HF_{254} (E. Merck AG) を用いた。シフト試薬は P_2O_5 上真空乾燥して保存したものを使用した。また略号として $\text{Eu}(\text{fod})_3 = \text{tris}(1, 1, 1, 2, 2, 3, 3\text{-heptafluoro-7, 7-dimethyl-4, 6-octanedionate})$ europium (III), $\text{Eu}(\text{dpm})_3 = \text{tris}(\text{dipivalomethanato})$ europium (III) を用いた。

第 1 章 第 2 節 付 属 実 験

17 β -Acetoxy-5 β -androstane-3-one (1) の NaBH_4 還元

(1) 335 mg を THF 4 ml に溶かし、氷冷下 NaBH_4 350 mg の水溶液 1 ml を徐々に滴下後 20 min 放置。AcOH を加えて過剰の NaBH_4 を分解し、エーテルで抽出。有機層を 5% NaHCO_3 、水で洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をアセトン-ヘキサンから再結晶し、5 β -androstane-3 α , 17 β -diol 17-acetate (2) 250 mg を無色針状晶として得。mp 172-173°. $[\alpha]_D^{23} + 14.8^\circ$ ($c = 0.51$). Anal. Calcd. $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$: C, 75.40; H, 10.25. Found: C, 75.12; H, 10.23. NMR (CDCl_3) δ : 0.76 (3H, s, 18- CH_3), 0.93 (3H, s, 19- CH_3), 2.01 (3H, s, - OCOCH_3), 3.30-3.80 (1H, m, $W_{1/2} = 20\text{ Hz}$, 3 β -H), 4.57 (1H, t, $J = 8\text{ Hz}$, 17 α -H). 母液を濃縮後得られる結晶性物質をベンゼン-エーテル (3:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す, R_f 値 0.34 の画分をアセトン-ヘキサンから再結晶し 5 β -androstane-3 β , 17 β -diol 17-acetate (3) 27 mg を無色針状晶として得。mp 137-138°. $[\alpha]_D^{20} + 9.2^\circ$ ($c = 0.49$). Anal. Calcd. $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$: C, 75.40; H, 10.25. Found: C, 75.56; H, 10.23. NMR (CDCl_3) δ : 0.76 (3H, s, 18- CH_3), 0.97 (3H, s, 19- CH_3), 2.01 (3H, s, - OCOCH_3), 4.10 (1H, m, $W_{1/2} = 7\text{ Hz}$, 3 α -H), 4.57 (1H, t, $J = 8\text{ Hz}$, 17 α -H), R_f 値 0.28 の画分からさらに (2) 43 mg を得。

5 β -Androstane-3 α , 17 β -diol 17-Acetate 3-p-Toluenesulfonate (4)

(2) 250 mg をピリジン 3 ml に溶かし p-TsCl 400 mg を徐々に加え 3 日間室温攪拌。反応液

に水を加えエーテルで抽出。有機層を5% HCl, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂ SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をヘキサンから再結晶し(4) 300 mg を無色葉状晶として得。mp 134–136°. $[\alpha]_D^{21} + 29.8^\circ$ ($c = 1.34$)。Anal. Calcd. C₂₈H₄₀O₅ S : C, 68.83 ; H, 8.25. Found : C, 69.20 ; H, 8.19. NMR(CDCl₃) δ : 0.75 (3H, s, 18-CH₃), 0.90 (3H, s, 19-CH₃), 2.02 (3H, s, -OCOCH₃), 2.43 (3H, s, Ar-CH₃), 4.50 (1H, m, 3 β -H), 4.57 (1H, t, J=8Hz, 17 α -H), 7.30, 7.78 (4H, d, J=8Hz, Ar-H)。

(4) の γ -コリジンとの反応

(4) 2.5 g を γ -コリジン 1.8 ml に溶かし 1.5 hr 加熱還流。反応液をエーテルで抽出。有機層を5% HCl, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂ SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を MeOH から数回分別再結晶し 5 β -androst-3-en-17 β -ol acetate (6) 310 mg を無色板状晶として得。mp 141–142°. NMR(CDCl₃) δ : 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 0.95 (3H, s, 19-CH₃), 2.03 (3H, s, -OCOCH₃), 4.57 (1H, t, J=8Hz, 17 α -H), 5.18–5.84 (2H, m, 3-and 4-H)。 (reported mp 138–140°)⁷⁰⁾。母液は精製せずにエポキシ化反応に付した。

3 β , 4 β -Epoxy-5 β -androstan-17 β -ol Acetate (8)

(6) 10 mg を CHCl₃ 5 ml に溶かし m-クロル過安息香酸 15 mg を加え一夜室温放置。エーテルで希釈後 5% Na₂ S₂O₃, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂ SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を MeOH から再結晶し(8) 10 mg を無色針状晶として得。mp 198–201°. NMR(CDCl₃) δ : 0.78 (3H, s, 18-CH₃), 0.87 (3H, s, 19-CH₃), 2.03 (3H, s, -OCOCH₃), 2.84 (1H, d, J=4.5Hz, 4 α -H), 3.20 (1H, m, 3 α -H), 4.57 (1H, t, J=8Hz, 17 α -H)。 (reported mp 195–196°)⁷¹⁾。

5 β -Androst-2-en-17 β -ol Acetate (5)

(7) 9 mg を AcOH 3 ml に溶かし, NaI 10 mg および AcONa 4 mg の水溶液 0.2 mg, Zn 末 8 mg を加え 2 hr 室温攪拌。Zn 末を濾去後, 濾液をエーテルで抽出。有機層を水, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂ SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を MeOH から再結晶し(5) 5 mg を無色針状晶として得。mp 98–99°. $[\alpha]_D^{21} - 5.8^\circ$ ($c = 0.60$)。Anal. Calcd. C₂₁H₃₂O₂ : C, 79.70 ; H, 10.19. Found : C, 79.36 ; H, 10.07. NMR(CDCl₃) δ : 0.78 (3H, s, 18-CH₃), 0.97 (3H, s, 19-CH₃), 2.02 (3H, s, -OCOCH₃), 4.57 (1H, t, J=8Hz, 17 α -H), 5.56 (2H, broad s, 2-and 3-H)。

(5) および (6) のエポキシ化反応

(5) および (6) の混合物 70 mg を CHCl₃ 5 ml に溶かし, m-クロル過安息香酸 70 mg を加え一夜室温放置。エーテルで希釈。5% Na₂ S₂O₃, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂ SO₄ で

乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をベンゼン-エーテル(3:1)を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.76 の画分を MeOH から再結晶し 2β, 3β-epoxy-5β-androstan-17β-ol acetate (7) 2.4 mg を無色針状晶として得。mp 129-131°. $[\alpha]_D^{21} + 3.3^\circ$ (*c* = 0.60). *Anal.* Calcd. C₂₁H₃₂O₃: C, 75.86; H, 9.70. Found: C, 75.75; H, 9.79. NMR (CDCl₃) δ: 0.77 (3H, s, 18-CH₃), 0.89 (3H, s, 19-CH₃), 2.03 (3H, s, -OCOCH₃), 2.90-3.30 (2H, m, 2α-and 3α-H), 4.57 (1H, t, J=8Hz, 17α-H). R_f 値 0.83 の画分をアセトン-ヘキサンから再結晶し (8) 4.5 mg を得。mp 198-201°.

(7) の LiAlH₄ 還元

(7) 8 mg を無水 THF 4 ml に溶かし LiAlH₄ 2.0 mg を加え 5 hr 加熱還流。含水エーテルで過剰の試薬を分解。25% ロッシェル塩溶液を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をベンゼン-エーテル(1:2)を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.51 の画分をアセトン-ヘキサンから再結晶し (9a) 5 mg を無色板状晶として得。mp 165-167°. 標品と混融し融点降下を認めず。両者の IR スペクトルは完全に一致。

(5) の Hydration 反応

(5) 1.38 mg を無水エーテル 6 ml に溶かし LiAlH₄ 5.0 mg のエーテル懸濁液 6 ml に加える。氷冷搅拌下 N₂ ガスを通じながら BF₃-etherate 2.60 mg のエーテル溶液 6 ml を 30 min にわたって徐々に滴下。1 hr 室温搅拌後含水エーテルを加えて過剰の試薬を分解。有機層を 5% NaHCO₃、水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる油状物を THF 6 ml に溶かし 10% NaOH 4 ml を加え、ついで 30% H₂O₂ 4 ml を徐々に滴下し氷冷下 1 hr 搅拌。水を加えて AcOEt で抽出。有機層を 5% NaHSO₃、5% NaHCO₃、水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をベンゼン-エーテル(1:2)を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.51 の画分をアセトン-ヘキサンから再結晶し (9a) 5 mg を無色板状晶として得。mp 164-165°. 標品と混融し融点降下を認めず。両者の IR スペクトルは完全に一致。

5β-Androstane-3β, 17β-diol Diacetate (9b)

(9a) 5 mg をピリジン 1 ml と Ac₂O 0.5 ml でアセチル化。常法通り処理し得られる油状物をベンゼン-エーテル(6:1)を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.46 の画分を MeOH から再結晶し (9b) 3 mg を無色針状晶として得。mp 108-110° (reported mp 106-107°)⁷²⁾.

(8) の LiAlH₄ による還元

(8) 3.0 mg を無水 THF 1.5 ml に溶かし LiAlH₄ 1.00 mg を加え 2.0 hr 加熱還流。(7) と同様に処理し得られる結晶性物質をベンゼン-エーテル(1:2)を展開溶媒とする preparative

TLCに付す。R_f 値 0.51 の画分 20 mg を Ac₂O とピリジンでアセチル化。常法通り処理した後ベンゼン-エーテル (6:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.46 の画分を MeOH から再結晶し (9b) 8 mg を無色針状晶として得。mp 108-110°。標品と混融し融点降下を認めず。両者の IR スペクトルは完全に一致。

(6) の Hydration 反応

(6) 10 mg を無水エーテル 2 ml に溶かし LiAlH₄ 20 mg のエーテル懸濁液 2 ml を加える。氷冷攪拌下 N₂ ガスを通じながら BF₃-etherate 170 mg のエーテル溶液 2 ml を 30 min にわたって徐々に滴下。(5) と同様に処理して得た結晶性物質をベンゼン-エーテル (1:2) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.51 の画分をアセトン-ヘキサンから再結晶し (9a) 6 mg を無色針状晶として得。mp 163-165°。標品と混融し融点降下を認めず。両者の IR スペクトルは完全に一致。

2α-d₁-5β-Androstane-3β, 17β-diol (10)

(7) 60 mg を無水 THF 2 ml に溶かし LiAlD₄ 100 mg を加え 5 hr 加熱還流。過剰の試薬を含水エーテルで分解。25% ロッセル塩溶液を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をベンゼン-エーテル (1:2) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.51 の画分をアセトン-ヘキサンから再結晶し (10) 56 mg を無色板状晶として得。mp 164-165°。(9a) と混融し融点降下を認めず。

2α-d₁-5β-Androstane-3, 17-dione (11)

(10) 56 mg をピリジン 1 ml に溶かし、CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬 2 ml を加え一夜室温放置。反応液をエーテルで希釈。有機層を 10% AcOH, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をベンゼン-エーテル (2:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.42 の画分をアセトン-ヘキサンから再結晶し (11) 30 mg を無色板状晶として得。mp 130-132°。5β-Androstane-3, 17-dione⁷³⁾ と混融し融点降下を認めず。MS m/e: 289 (M⁺) (98% d₁)。

2β-d₁-5β-Androstane-3β, 17β-diol (12)

(5) 77 mg を無水エーテル 5 ml に溶かし、これを LiAlD₄ 170 mg のエーテル懸濁液 5 ml に加える。氷冷攪拌下 N₂ ガスを通じながら BF₃-etherate 1 g のエーテル溶液 5 ml を 30 min にわたって徐々に滴下。1 hr 室温攪拌後含水エーテルを加え過剰の試薬を分解。有機層を 5% NaHCO₃, 水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる油状物を THF 10 ml に溶かし 10% NaOH 7 ml を加え、ついで氷冷下攪拌しながら 30% H₂O₂ 7 ml を徐々に滴下し 1 hr 攪拌。水を加えて AcOEt で抽出。有機層を 5% NaHSO₃, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をベンゼン-エーテル (1:2) を展開溶媒とする preparative

TLCに付す。R_f 値 0.51 の画分をアセトン-ヘキサンから再結晶し(12) 30 mg を無色板状晶として得。mp 164-165°。(9a)と混融し融点降下を認めず。

2β-d₁-5β-Androstane-3, 17-dione (13)

(12) 30 mg をピリジン 1 ml に溶かし, CrO₃-ピリジン(1:10 w/v) 試薬 2 ml を加え一夜室温放置。(10)と同様に処理, アセトン-ヘキサンから再結晶し(13) 20 mg を無色板状晶として得。mp 130-132°。5β-Androstane-3, 17-dione⁷³⁾と混融し融点降下を認めず。MS m/e: 289 (M⁺) (98% d₁)。

4α-d₁-5β-Androstane-3, 17-dione (15)

(8) 204 mg を無水 THF 8 ml に溶かし LiAlD₄ 300 mg を加え 18 hr 加熱還流。(7)と同様に処理し得られる結晶性物質をベンゼン-エーテル(1:2)を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.51 の画分から 4α-d₁-5β-androstane-3β, 17β-diol (14)を得。(14)を(10)と同様に処理, アセトン-ヘキサンから再結晶し(15) 50 mg を無色板状晶として得。mp 131-132°。5β-Androstane-3, 17-dione⁷³⁾と混融し融点降下を認めず。MS m/e: 289 (M⁺) (98% d₁)。

4β-d₁-5β-Androstane-3β, 17β-diol (16)

(6) 151 mg を無水エーテル 10 ml に溶かし, LiAlD₄ 309 mg と BF₃-etherate 2.6 g を用いて deuterioboration を行なう。(5)と同様に処理, アセトン-ヘキサンから再結晶し(16) 65 mg を無色板状晶として得。mp 161-163°。(9a)と混融し融点降下を認めず。

4β-d₁-5β-Androstane-3, 17-dione (17)

(16) 65 mg を CrO₃-ピリジン(1:10 w/v) 試薬で酸化。(10)と同様に処理, アセトン-ヘキサンから再結晶し(17) 50 mg を無色板状晶として得。mp 132-133.5°。5β-Androstane-3, 17-dione⁷³⁾と混融し融点降下を認めず。MS m/e: 289 (M⁺) (98% d₁)。

第1章第3節付属実験

Materials

基質の2-および4-d₁-5β-androstane-3, 17-diones は第1章第2節で合成した(11), (13), (15)および(17)を用いた。

Cell-free Extract の調製

培地は corn steep liquor 0.6%, NH₄H₂PO₄ 0.3%, CaCO₃ 0.25%, soybean oil 0.22%, yeast extract 0.25% および glucose 1% を溶かして全量 1 l に調製し, *Nocardia restrictus* (ATCC 14887) を 27°, 1 週間振盪培養した。ついで 3,000 × g, 30 min 遠心分離し, 0.03 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 2 度洗浄。集めた菌体を直ちに少量の緩衝液に懸濁

したのち10 kcのmagnetostrictive oscillatorで30 min超音波処理した。ついで105,000×g 30 min遠心分離して上清100 mlを得、これをそのまま酵素源として用いた。

Cell-free Extractによる脱水素反応

各基質(11, 13, 15および17)をDMFに溶かし, phenazine methosulfate (PMS) および cell-free extract (0.03 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で6 mg protein/mlの濃度に調製)を加えてつぎのように調製し27°で20 hrインキュベートした。

Substrate mg	DMF ml	PMS mg	Supernatant ml	Total volume ml
(11) 20.5	0.5	120	12	200
(13) 11.0	0.4	60	6	100
(15) 10.0	0.3	60	6	100
(17) 22.5	0.6	150	15	240

抽出ならびに分離

インキュベーション混合物をAcOEtで抽出。有機層を水洗し無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる油状物をベンゼン-エーテル(1:1)を展開溶媒とする preparative TLCに付す。R_f値0.32および0.20の画分をそれぞれアセトン-ヘキサンから再結晶。前者から androst-4-ene-3, 17-dioneを無色柱状晶(mp 171-172°), 後者から androsta-1, 4-diene-3, 17-dioneを無色柱状晶(mp 139-140°)として, とともに40%の変換率で得。

第2章第2節付属実験

4α, 17α-d₂-5α-Androstane-3α, 17β-diol (19a)

(19b) 170 mgをアセトン20 mlに溶かし, 5N HCl 2 mlを加え30 min 60°に加温。溶媒留去後残渣をAcOEtで抽出。有機層を5% NaHCO₃, 水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をMeOHから再結晶し(19a) 91 mgを無色葉状晶として得。mp 217-219°。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 2170 (C-D), 5α-Androstane-3α, 17β-diolと混融し融点降下を認めず。MS m_e : 294 (M⁺) (98% d₂).

4α, 17α-d₂-5α-Androstane-3α, 17β-diol Bis(tert-butylidimethylsilyl) Ether (19b)

5α-Androst-3-en-17-one(18)³⁵⁾ 360 mgを無水エーテル40 mlに溶かし, これをLiAlD₄ 500 mgのエーテル懸濁液に加える。氷冷攪拌下N₂ガスを通じながらBF₃-etherate 5 gのエーテル溶液16 mlを30 minにわたって徐々に滴下, 1 hr室温攪拌。含水エーテルを加えて過剰の試薬を分解しAcOEtで抽出。有機層を5% NaHCO₃, 水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去

後得られる油状物を THF 30 ml に溶かし 10% NaOH 16 ml を加え氷冷搅拌下 30% H₂O₂ 30 ml を徐々に滴下。さらに 0° で 1 hr 搅拌。水を加えて AcOEt で抽出。有機層を 5% NaHSO₃, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を DMF 2 ml に溶かし *tert*-butyldimethylsilyl chloride 600 mg, imidazole 800 mg を加え 2 hr 室温搅拌。水で希釈しエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーに付す。ヘキサン溶出画分より得られる結晶性物質をアセトンから再結晶し (19b) 200 mg を無色板状晶として得。mp 123–124°. 5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol bis(*tert*-butyldimethylsilyl) ether³⁶⁾ と混融し融点降下を認めず。

4 α -d₁-5 α -Androstane-3, 17-dione (20)

(19a) 90 mg をピリジン 2 ml に溶かし, CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬 4 ml を加え 8 hr 室温放置。反応液をエーテルで希釈し, 10% AcOH, 5% Na₂CO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をヘキサン-AcOEt (4:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。アセトン-ヘキサンから再結晶し (20) 47 mg を無色葉状晶として得。mp 129–131°. 5 α -Androstane-3, 17-dione と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 289 (M⁺) (97% d₁) .

4 β , 17 α -d₂-5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol (22)

3 α , 4 α -Epoxy-5 α -androstane-17-one (21)³⁵⁾ 179 mg を無水 THF 12 ml に溶かし, LiAlD₄ 150 mg を加え 5 hr 加熱還流。過剰の試薬を含水 AcOEt で分解。20% ロッセル塩を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をアセトンから再結晶し (22) 172 mg を無色葉状晶として得。mp 219–222°. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 2170 (C-D). 5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 294 (M⁺) (98% d₂) .

4 β -d₁-5 α -Androstane-3, 17-dione (23)

(22) 170 mg をピリジン 5 ml に溶かし CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬 10 ml で酸化。(19a) と同様に処理後アセトン-ヘキサンから再結晶し (23) 51 mg を無色葉状晶として得。mp 131.5–132.5°. 5 α -Androstane-3, 17-dione と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 289 (M⁺) (95% d₁) .

第 2 章第 3 節 付属実験

Materials

基質の epimeric 4-d₁-5 α -androstane-3, 17-diones (20, 23) は第 2 章第 2 節で合

成したものを用了。

Cell-free Extract の調製

培地の調製は第1章第3節の方法に準じて行ない、*Nocardia restrictus* (ATCC 14887) を27°、1週間振盪培養した。ついで3,000×g, 30min 遠心分離し、0.03Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で2回洗浄。集めた菌体を直ちに少量の緩衝液に懸濁したのち10kcのmagnetostrictive oscillatorで20min超音波処理した。ついで3,000×g, 30min 遠心分離して上清50mlを得。これをそのまま酵素源として用了。

Cell-free Extract による脱水素反応

Epimeric 4-d₁-5α-androstane-3,17-diones (20, 23) 各々5mgをDMF 0.1mlに溶かし、PMS 30mgおよびcell-free extract 1mlを加え、0.03Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で全量を50mlとしたのち27°で15hrインキュベートした。

抽出ならびに分離

インキュベーション混合物をAcOEtで抽出。有機層を水洗し無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる油状物をベンゼン-エーテル(1:1)を展開溶媒とするpreparative TLCに付す。R_f値0.32および0.20の画分をそれぞれアセトン-ヘキサンから再結晶。前者からandrost-4-ene-3,17-dioneを無色柱状晶(mp 172.5-173°), 後者からandrost-1,4-diene-3,17-dioneを無色柱状晶(mp 139-140°)として、ともに20%の変換率で得。変換生成物のNMRスペクトルデータは以下に示すとおりであった。

Product	Chemical shift(δ) ppm		
	C ₁ -H	C ₂ -H	C ₄ -H
4α-D Substrate (20)			
Δ ⁴	—	—	none
Δ ^{1,4}	7.00 (d, J=10.5Hz)	6.20 (d, J=10.5Hz)	none
4β-D Substrate (23)			
Δ ⁴	—	—	5.76 (s)
Δ ^{1,4}	7.00 (d, J=10.5Hz)	6.20 (dd, J=10.5, 1.5Hz)	6.06 (d, J=1.5Hz)

第3章第2節 付属実験

4-Bromotestosterone *tert*-Butyldimethylsilyl Ether (25)

4-Bromotestosterone (24)⁷⁴⁾ 146mgをDMF 0.5mlに溶かし、*tert*-butyldimethylsilyl chloride 150mgおよびimidazole 300mgを加え15min室温放置。反応液を水で希釈し

エーテルで抽出。有機層を水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる粗結晶をヘキサン-AcOEt (20:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。エーテル-MeOH から再結晶し (25) 200 mg を無色板状晶として得。mp 173-174.5°. $[\alpha]_D^{18} + 88.9^\circ$ ($c = 0.18$) . Anal. Calcd. C₂₅H₄₁O₂BrSi : C, 62.35 ; H, 8.58 . Found : C, 62.67 ; H, 8.87 . NMR (CDCl₃) δ : 0 (6H, s, Si-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃), 0.87 (9H, s, *tert*-C₄H₉), 1.22 (3H, s, 19-CH₃), 3.54 (1H, t, J=7Hz, 17 α -H) .

(25) の LiAlH₄ 還元

(25) 30 mg を無水エーテル 8 ml に溶かし, LiAlH₄ 50 mg を加え 5 hr 加熱還流。含水エーテルで過剰の試薬を分解後 20% ロッセル塩溶液を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる粗結晶をヘキサン-AcOEt (10:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。MeOH から再結晶し androst-4-ene-3 β , 17 β -diol 17-*tert*-butyldimethylsilyl ether (26a) 10 mg を無色葉状晶として得。mp 140-142°. 標品³⁶⁾と混融して融点降下を認めず。両者の IR スペクトルは完全に一致。

4-*d*₁-Testosterone *tert*-Butyldimethylsilyl Ether (30)

(25) 200 mg を無水エーテル 20 ml に溶かし, LiAlD₄ 200 mg を加え 10 hr 加熱還流。含水エーテルで過剰の試薬を分解後 20% ロッセル塩溶液を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサン-AcOEt (10:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.4 の画分より 3 α -*d*₁-4-bromoandrost-4-ene-3 β , 17 β -diol 17-*tert*-butyldimethylsilyl ether (31b) 90 mg を得。R_f 値 0.3 の画分を MeOH から再結晶し 3 α , 4-*d*₂-androst-4-ene-3 β , 17 β -diol 17-*tert*-butyldimethylsilyl ether (29) 30 mg を無色葉状晶として得。mp 141-142°. Androst-4-ene-3 β , 17 β -diol 17-*tert*-butyldimethylsilyl ether³⁶⁾と混融し融点降下を認めず。(29) 27 mg をピリジン 0.5 ml に溶かし, CrO₃-ピリジン試薬 (1:10 w/v) 1 ml を加え 1.5 hr 室温放置。反応液を AcOEt で希釈し 10% AcOH, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を MeOH から再結晶し (30) 22 mg を無色葉状晶として得。mp 140-140.5°. Testosterone *tert*-butyldimethylsilyl ether³⁶⁾と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 403 (M⁺) (85% *d*₁) . NMR スペクトルの解析の結果, 重水素を 4 位に保持することが判明。

4-Bromoandrost-4-ene-3 β , 17 β -diol 17-*tert*-Butyldimethylsilyl Ether (26b)

LiAlH₄ 400 mg と *tert*-BuOH 3.5 ml より製した LiAl(*tert*-BuO)₃H の無水エーテル溶液 3.5 ml に (25) 300 mg の無水エーテル溶液 10 ml を加え 30 min 室温撹拌。含水エーテルで過剰の

試薬を分解後 20% ロッシェル塩溶液を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を MeOH から再結晶し (26b) 210 mg を無色葉状晶として得。mp 121–123°. $[\alpha]_D^{21} + 5.0.0^\circ$ ($c=0.14$)。Anal. Calcd. $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{O}_2\text{BrSi}$: C, 62.09; H, 8.96. Found: C, 62.31; H, 9.00. NMR (CDCl_3) δ : 0 (6H, s, Si-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃), 0.87 (9H, s, *tert*-C₄H₉), 1.09 (3H, s, 19-CH₃), 3.51 (1H, t, $J=7\text{Hz}$, 17 α -H), 3.90–4.20 (1H, m, 3 α -H)。

4-*d*₁-Androst-4-ene-3 β , 17 β -diol 17-*tert*-Butyldimethylsilyl Ether (32)

(26b) 50 mg を無水エーテル 10 ml に溶かし, LiAlD_4 50 mg を加え 28 hr 加熱還流。含水エーテルで過剰の試薬を分解後 20% ロッシェル塩溶液を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサノン-AcOEt (10:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。MeOH から再結晶し (32) 24 mg を無色葉状晶として得。Androst-4-ene-3 β , 17 β -diol 17-*tert*-butyldimethylsilyl ether³⁶⁾と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 405 (M^+) (70% d_1)。NMR スペクトルの解析の結果重水素を 4 位に保持することが判明。

4-Bromoandrost-4-ene-3 β , 17 β -diol (27)

LiAlH_4 300 mg と *tert*-BuOH 2.5 ml より製した $\text{LiAl}(\text{tert-BuO})_3\text{H}$ のエーテル溶液 20 ml に (24) 100 mg のエーテル溶液 10 ml を加え 30 min 室温攪拌。含水 AcOEt で過剰の試薬を分解後 20% ロッシェル塩溶液を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をアセトンから再結晶し (27) 50 mg を無色針状晶として得。mp 216–218°. $[\alpha]_D^{18} + 57.1^\circ$ ($c=0.21$)。Anal. Calcd. $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_2\text{Br}$: C, 61.78; H, 7.91. Found: C, 61.90; H, 7.94. NMR (CDCl_3) δ : 0.78 (3H, s, 18-CH₃), 1.12 (3H, s, 19-CH₃), 3.65 (1H, t, $J=7\text{Hz}$, 17 α -H), 4.08–4.32 (1H, m, 3 α -H)。

4-Bromoandrost-4-ene-3, 17-dione (28)

(27) 10 mg をピリジン 0.2 ml に溶かし, CrO_3 -ピリジン (1:10 w/v) 試薬 0.5 ml を加え 4 hr 室温攪拌。AcOEt で希釈し 10% AcOH, 5% NaHCO_3 , 水で順次洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサノン-AcOEt (2:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。 CH_2Cl_2 -ヘキサノンから再結晶し (28) 8 mg を無色針状晶として得。mp 151–152°. $[\alpha]_D^{14} + 183.3^\circ$ ($c=0.12$)。Anal. Calcd. $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_2\text{Br}$: C, 62.46; H, 6.90. Found: C, 62.38; H, 6.81. NMR (CDCl_3) δ : 0.92 (3H, s, 18-CH₃), 1.26 (3H, s, 19-CH₃)。

3 α -d₁-4-Bromoandrost-4-ene-3 β , 17 β -diol (31a)

(24) 50 mg を THF 4 ml に溶かし LiAlD₄ 50 mg を加え 8 hr 室温放置。含水 AcOEt で過剰の試薬を分解後 20% ロッシェル塩溶液を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をベンゼン-エーテル (2:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。アセトンから再結晶し (31a) 23 mg を無色針状晶として得。mp 212-215°。(27) と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 370 (M⁺) (98% d₁)。NMR スペクトルにおいて 3 α -H にもとづくシグナルは完全に消失。

3 α -d₁-Androst-4-ene-3 β , 17 β -diol (33)

(31a) 20 mg を THF 6 ml に溶かし LiAlH₄ 30 mg を加え 16 hr 加熱還流。含水 AcOEt で過剰の試薬を分解後 20% ロッシェル塩溶液を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる粗結晶をベンゼン-エーテル (2:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.5 の画分を MeOH から再結晶し (33) 10 mg を無色板状晶として得。mp 150-153°。Androst-4-ene-3 β , 17 β -diol と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 291 (M⁺) (98% d₁)。NMR スペクトルにおいて 3 α -H にもとづくシグナルは完全に消失。

5 α -Androstane-3 β , 4 α , 17 β -triol 3, 17-Bis (tert-butyl dimethylsilyl) Ether (35b)

Androst-4-ene-3 β , 17 β -diol bis (tert-butyl dimethylsilyl) ether (34)³⁶⁾ 250 mg を無水エーテル 42 ml に溶かし、LiAlH₄ 400 mg を加え氷冷撹拌下 N₂ ガスを通じながら BF₃-etherate 3 g のエーテル溶液 18 ml を 15 min にわたって滴下後 1 hr 室温撹拌。含水エーテルで過剰の試薬を分解しエーテルで抽出。有機層を 5% NaHCO₃、水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる油状物を THF 10 ml に溶かし 10% NaOH 4 ml を加え、氷冷撹拌下 30% H₂O₂ 3 ml を徐々に滴下し、さらに 0° で 1 hr 撹拌。水を加えエーテルで抽出。有機層を 5% NaHSO₃、5% NaHCO₃、水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサン-AcOEt (30:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。MeOH から再結晶し (35b) 200 mg を無色葉状晶として得。mp 151.5-152°。[α]_D²¹ +3.1° (c=0.16)。Anal. Calcd. C₃₁H₆₀O₃Si₂: C, 69.34; H, 11.26。Found: C, 69.15; H, 11.27。NMR (CDCl₃) δ : 0 (6H, s, 17-OSi(CH₃)₂), 0.08 (6H, s, 3-OSi(CH₃)₂), 0.68 (3H, s, 18-CH₃), 0.84 (3H, s, 19-CH₃), 0.88 (9H, s, 17-OSi-tert-C₄H₉), 0.91 (9H, s, 3-OSi-tert-C₄H₉), 3.24-3.68 (3H, m, 3 α -, 4 β -and 17 α -H)。

5 α -Androstane-3 β , 4 α , 17 β -triol (35a)

(35b) 20 mg を MeOH 2 ml に溶かし 20% HCl 0.3 ml を加え 15 min 室温放置。AcOEt で希釈し、5% NaHCO₃、水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を MeOH から

再結晶し (35a) 7 mg を無色針状晶として得。mp 245–248°. (reported mp 248–250°)⁷⁵⁾。

4 α - Acetoxy - 5 α - androstane - 3 β , 17 β - diol Bis (tert-butyl dimethylsilyl) Ether (35c)

(35b) 30 mg をピリジンと Ac₂O 0.5 ml で常法通りアセチル化。生成物をヘキサノン - AcOEt (30:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製し (35c) 17 mg を無色無晶形物質として得。[α]_D¹⁶ + 27.3° (c = 0.22)。Anal. Calcd. C₃₃H₆₂O₄Si₂: C, 68.46; H, 10.80. Found: C, 68.61; H, 10.89. NMR (CDCl₃) δ : 0 (6H, s, 17-OSi(CH₃)₂), 0.01, 0.03 (6H, each s, 3-OSi(CH₃)₂), 0.66 (3H, s, 18-CH₃), 0.80 (3H, s, 19-CH₃), 0.83, 0.86 (18H, each s, tert-C₄H₉), 2.01 (3H, s, -OCOCH₃), 3.27–3.70 (2H, m, 3 α - and 17 α -H), 4.60–5.00 (1H, m, 4 β -H)。

3 β , 17 β - Dihydroxy - 5 α - androstan - 4 - one Bis (tert-butyl dimethylsilyl) Ether (36)

(35b) 140 mg をピリジン 2 ml に溶かし CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬 10 ml を加え 5 日間室温撹拌。エーテルで希釈し 10% AcOH, 10% Na₂CO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をヘキサノン-ベンゼン (2:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。アセトンから再結晶し (36) 85 mg を無色葉状晶として得。mp 158–160°。[α]_D²¹ - 11.6° (c = 0.43)。Anal. Calcd. C₃₂H₅₈O₃Si₂: C, 69.61; H, 10.93. Found: C, 69.68; H, 10.73. NMR (CDCl₃) δ : 0, 0.15 (12H, each s, Si-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃), 0.76 (3H, s, 19-CH₃), 0.88, 0.92 (18H, each s, tert-C₄H₉), 3.62 (1H, t, J = 7 Hz, 17 α -H), 4.12–4.36 (1H, m, 3 α -H)。

5 α - Androstane - 3 β , 4 β , 17 β - triol 3, 17 - Bis (tert-butyl dimethylsilyl) Ether (37b)

(36) 10 mg を無水エーテル 2 ml に溶かし, LiAlH₄ 10 mg を加え 25 min 室温撹拌。含水エーテルで過剰の試薬を分解後 20% ロッセル塩溶液を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物を DMF 0.5 ml に溶かし tert-butyl dimethylsilyl chloride 150 mg と imidazole 300 mg を加え 1.5 hr 室温放置。水を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をヘキサノン-ベンゼン (2:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。MeOH から再結晶し (37b) 7 mg を無色葉状晶として得。mp 175–176°。[α]_D²¹ - 30.0° (c = 0.15)。Anal. Calcd. C₃₁H₆₀O₃Si₂: C, 69.34; H, 11.26. Found: C, 69.37; H, 11.42. NMR (CDCl₃) δ : 0 (6H, s, 17-OSi(CH₃)₂), 0.08 (6H, s, 3-O-Si(CH₃)₂), 0.70 (3H, s, 18-CH₃), 1.06 (3H, s, 19-CH₃), 0.88, 0.92 (18H, each s, tert-C₄H₉), 3.48–3.80 (3H, m, 3 α -, 4 α -

and 17 α -H).

5 α -Androstane-3 β , 4 β , 17 β -triol (37a)

(37b) 27mgをMeOH 4mlに溶かし, 20% HCl 0.5mlを加え(35b)と同様に加水分解。MeOHから再結晶し(37a) 15mgを無色柱状晶として得。mp 258-261°. $[\alpha]_D^{18} - 4.2^\circ$ ($c = 0.12$, MeOH). Anal. Calcd. C₁₉H₃₂O₃: C, 73.98; H, 10.46. Found: C, 73.84; H, 10.56.

5 α -Androstane-3 β , 4 β , 17 β -triol 3, 4-Acetonide (38)

(37a) 8mgをアセトン10mlに溶かし, 無水CuSO₄ 100mgを加え8hr加熱還流。反応液を濾過し濾液を濃縮。得られる生成物をヘキサン-AcOEt(1:1)を展開溶媒とする preparative TLCで精製。MeOHから再結晶し(38) 6mgを無色針状晶として得。mp 173-174°. $[\alpha]_D^{15} - 19.2^\circ$ ($c = 0.13$). Anal. Calcd. C₂₂H₃₆O₃: C, 75.81; H, 10.41. Found: C, 75.67; H, 10.49. NMR(CDCl₃) δ : 0.76(3H, s, 18-CH₃), 1.08(3H, s, 19-CH₃), 1.32, 1.53(6H, each s, >C(CH₃)₂), 3.64(1H, t, J=7Hz, 17 α -H), 3.92-4.08(2H, m, 3 α - and 4 α -H).

(37b)のCrO₃酸化

(37b) 10mgをピリジン0.5mlに溶かし, CrO₃-ピリジン(1:10 w/v)試薬1mlを加え22hr室温放置。エーテルで希釈し10% AcOH, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水Na₂SO₄で乾燥。得られる結晶性物質をアセトンから再結晶し(36) 7mgを無色葉状晶として得。mp 155-157°. 標品と混融し融点降下を認めず。両者のIRスペクトルは完全に一致。

(37b)の脱水反応

(37b) 10mgをピリジン1mlに溶かし, 氷冷下POCl₃ 0.2mlを加え24hr室温放置。含水エーテルで過剰の試薬を分解後水を加えエーテルで抽出。有機層を5% NaHCO₃, 水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサン-AcOEt(100:1)を展開溶媒とする preparative TLCで精製。MeOHから再結晶し(34) 5mgを無色葉状晶として得。mp 100.5-102°. 標品³⁶⁾と混融し融点降下を認めず。両者のIRスペクトルは完全に一致。

4 α -d₁-5 α -Androstane-3 β , 4 β , 17 β -triol 3,17-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl) Ether (39)

(36) 500mgを無水エーテル20mlに溶かし, LiAlD₄ 300mgを加え2.5hr室温搅拌。含水エーテルで過剰の試薬を分解後20% ロッセル塩溶液を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をDMF 6mlに溶かし, *tert*-butyldimethylsilyl chloride 1g, imidazole 1.5gを加え30min室温搅拌。水を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をヘキサン-ベンゼン(2:1)を展開溶媒とする preparative TLCで精製。MeOHから再結晶し(39) 400mgを無色葉状晶

として得。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2100 (C-D), mp 175–176°, (37b) と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 537 (M^+) (98% d_1)。

4- d_1 -Androst-4-ene-3 β , 17 β -diol Bis(*tert*-butyldimethylsilyl) Ether (40b)

(39) 200 mg をピリジン 6 ml に溶かし, POCl₃ 0.6 ml を加え (37b) と同様に処理し得られる生成物をヘキサン-AcOEt (100:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。MeOH から再結晶し (40b) 140 mg を無色針状晶として得。mp 97–99°, (34) と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 519 (M^+) (98% d_1)。NMR スペクトルにおいて 4-H シグナルは完全に消失。

4- d_1 -Androst-4-ene-3 β , 17 β -diol (40a)

(40b) 80 mg を THF 0.5 ml に溶かし, (*n*-C₄H₉)₄NF 2 ml を加え 20 hr 室温攪拌。AcOEt で希釈, 水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をベンゼン-EtOH (10:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。MeOH から再結晶し (40a) 36 mg を無色板状晶として得。mp 154–155°, Androst-4-ene-3 β , 17 β -diol と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 291 (M^+) (98% d_1)。NMR スペクトルにおいて 4-H シグナルは完全に消失。

(40a) の CrO₃ 酸化

(40a) 28 mg をピリジン 0.5 ml に溶かし, CrO₃-ピリジン (1:20 w/v) 試薬 1 ml を加え 30 min 室温放置。AcOEt で希釈し 10% AcOH, 10% Na₂CO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサン-AcOEt (1:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.60 の画分をアセトン-ヘキサンから再結晶し 4- d_1 -androst-4-ene-3, 17-dione (42) 6 mg を無色板状晶として得。mp 170.5–172°, Androst-4-ene-3, 17-dione と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 287 (M^+) (98% d_1)。R_f 値 0.47 の画分をアセトン-ヘキサンから再結晶し 4- d_1 -testosterone (41) 4 mg を無色板状晶として得。mp 143.5–144°, Testosterone と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 289 (M^+) (98% d_1)。(41) および (42) は NMR スペクトルにおいて 4-H シグナルは完全に消失。

第 3 章 第 3 節 付属実験

Materials

基質の 4- d_1 -androst-4-ene-3, 17-dione (42) は第 3 章第 2 節で, epimeric-4- d_1 -5 α -androstane-3, 17-diones (20, 23) は第 2 章第 2 節でそれぞれ合成したものを用いた。5 α -Androstane-3 β , 17 β -diol 17-*tert*-butyldimethylsilyl ether は Hosoda ら³⁶⁾の方法に準じて合成した。

2 β -d₁-5 α -Androstane-3, 17-dione

2 β -d₁-5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol 17-*tert*-butyldimethylsilyl ether⁴⁰⁾ 50 mg をアセトン 10 ml に溶かし, 5N HCl 1 ml を加え 1 hr 室温搅拌。5% NaHCO₃ で中和後減圧下溶媒を留去し AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を MeOH から再結晶し 2 β -d₁-5 α -androstane-3 α , 17 β -diol 29 mg を無色板状晶として得。mp 222-224°. 5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol と混融し融点降下を認めず。3, 17-Diol 体 50 mg をピリジン 4 ml に溶かし CrO₃-ピリジン試薬 (1:10 w/v) 4 ml を加え 5 hr 室温放置。エーテルで希釈し, 10% AcOH, 10% Na₂CO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサン-AcOEt (4:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。アセトン-ヘキサンから再結晶し 2 β -d₁-5 α -androstane-3, 17-dione 37 mg を無色葉状晶として得。mp 131-132°. 5 α -Androstane-3, 17-dione と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 289 (M⁺) (98% d₁)。

2 α -d₁-5 α -Androstane-3, 17-dione

2 α -d₁-5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol 17-*tert*-butyldimethylsilyl ether⁴⁰⁾ 100 mg をアセトンに溶かし, 2 β -D 体と同様に 5N HCl で加水分解。得られる結晶性物質を MeOH から再結晶し 2 α -d₁-5 α -androstane-3 α , 17 β -diol 59 mg を無色板状晶として得。mp 222-224°. 5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol と混融し融点降下を認めず。3, 17-Diol 体 50 mg を 2 β -D 体と同様に CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬を用いる酸化反応に付す。得られる粗結晶をヘキサン-AcOEt (4:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。アセトン-ヘキサンから再結晶し 2 α -d₁-5 α -androstane-3, 17-dione 32 mg を無色葉状晶として得。mp 131-132°. 5 α -Androstane-3, 17-dione と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 289 (M⁺) (98% d₁)。

微生物変換

Penicillium decumbens (NRRL 742) の培養はグルコース含有ポテト培地を用いること以外は Miller ら⁴⁵⁾ の方法に準じて行なった。基質 124 mg を EtOH 2.5 ml に溶かし, これを 24 hr culture 500 ml に加え 27° に 72 hr インキュベート。インキュベーション混合物を AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をヘキサン-AcOEt (2:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。アセトン-ヘキサンから再結晶し 4 α -d₁-5 α -androstane-3, 17-dione (43) 101 mg を得。mp 130-131.5°. 5 α -Androstane-3, 17-dione と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 289 (M⁺) (92% d₁)。

(43) の $4\alpha-d_1-5\alpha$ -Androstane- $3\beta, 17\beta$ -diol 17-*tert*-Butyldimethylsilyl ether (44) への誘導

微生物変換によって得た $4\alpha-d_1-5\alpha$ -androstane- $3, 17$ -dione (43) 95 mg を無水エーテル 20 ml に溶かし, LiAlH_4 100 mg で $3, 17$ -diol に還元。DMF-ピリジン (1 ml) の混液中 imidazole 800 mg, *tert*-butyldimethylsilyl chloride 500 mg を用いてシリル化し $3\beta, 17\beta$ -bis(*tert*-butyldimethylsilyl) ether 130 mg を得。ついで Hosoda ら³⁶⁾の方法に準じ 3 位を選択的に酸で加水分解して (44) 46 mg を得。mp 164–165°. 5α -Androstane- $3\beta, 17\beta$ -diol 17-*tert*-butyldimethylsilyl ether と混融し融点降下を認めず。

第 4 章 第 2 節 付 属 実 験

5α -Cholest-2-en-5-ol (46)

5α -Cholestane- $3\beta, 5$ -diol 3-*p*-toluenesulfonate (45c) 1.6 g を一夜活性アルミナ 100 g に吸着。ヘキサン-ベンゼン (4:1) で溶出する画分をアセトンから再結晶し (46) 600 mg を無色板状晶として得。mp 94.5–95.5°. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$: C, 83.87; H, 11.99. Found: C, 83.79; H, 11.94. NMR (CDCl_3) δ : 0.65 (3H, s, 18- CH_3), 0.85, 0.92 (12H, s, 19-, 21-, 26-, and 27- CH_3), 5.59 (2H, m, 2- and 3-H). (reported mp 93–95°)⁷⁶⁾.

$2\alpha, 3\alpha$ -Epoxy- 5α -cholestan-5-ol (47)

(46) 480 mg をベンゼン 15 ml に溶かし, m-クロル過安息香酸 380 mg を加え 4.5 hr 室温撹拌。反応液をベンゼンで希釈, 5% NaHSO_3 , 5% NaHCO_3 , 水で順次洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる生成物を MeOH から再結晶し (47) 320 mg を無色板状晶として得。mp 142–143°. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2$: C, 80.54; H, 11.52. Found: C, 80.04; H, 11.34. NMR (CDCl_3) δ : 0.65 (3H, s, 18- CH_3), 0.80, 0.91 (12H, s, 19-, 21-, 26- and 27- CH_3), 3.38 (2H, m, 2 β - and 3 β -H). (reported mp 144–145°)⁷⁵⁾.

(47) の LiAlH_4 還元

(47) 491 mg を無水 THF 40 ml に溶かし, LiAlH_4 340 mg を加え 1.5 hr 加熱還流。含水 AcOEt で過剰の試薬を分解。20% ロッセル塩溶液を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を MeOH から再結晶し 5α -cholestan- $3\alpha, 5$ -diol (53) 306 mg を無色葉状晶として得。mp 198–200°. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_2$: C, 80.14; H, 11.96. Found: C, 79.87; H, 11.86. NMR (CDCl_3) δ : 0.64 (3H, s, 18- CH_3), 0.80, 0.91 (12H, s, 19-, 21-, 26- and 27- CH_3), 4.00 (1H, m, $\text{W}_{1/2}=6\text{Hz}$, 3 β -H). (reported mp 195–198°)⁷⁷⁾.

(46) の Hydration 反応

(46) 500 mg を無水 THF 50 ml に溶かし、氷冷撹拌下 LiAlH_4 600 mg と BF_3 -etherate 5 g より発生させた B_2H_6 ガスを 3.5 hr にわたって通導。含水エーテルで過剰の試薬を分解、エーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる油状物を THF 5 ml に溶かし、氷冷下 10% NaOH 3 ml を加え、30% H_2O_2 3 ml を徐々に滴下、 0° で 1 hr 撹拌。反応液を水で希釈し AcOEt で抽出。有機層を 5% NaHCO_3 、水で洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をベンゼン- AcOEt (3:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。 R_f 値 0.49 の画分を MeOH から再結晶し (53) 112 mg を無色葉状晶として得。mp $199-200^\circ$ 。 R_f 値 0.18 の画分を MeOH から再結晶し 5 α -cholestan-3 β , 5-diol (45a) 97 mg を無色針状晶として得。mp $218-219^\circ$ 。いずれも標品と混融し融点降下を認めず。

Cholest-4-en-3 β -ol Acetate (48) のエポキシ化反応

(48) 186 mg をベンゼン 22 ml に溶かし m-クロル過安息香酸 125 mg を加え一夜室温放置。 AcOEt で希釈。5% NaHSO_3 、5% NaHCO_3 、水で順次洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーに付す。ヘキサン-ベンゼン (4:1) で溶出する画分を MeOH から再結晶し 4 α , 5-epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol acetate (49b) 76 mg を無色板状晶として得。mp $120-121^\circ$ 。 *Anal.* Calcd. $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_3$: C, 78.32; H, 10.88. Found: C, 78.46; H, 10.80. NMR (CDCl_3) δ : 0.68 (3H, s, 18- CH_3), 0.80, 0.91 (9H, s, 21-, 26-, and 27- CH_3), 1.11 (3H, s, 19- CH_3), 2.08 (3H, s, - OCOCH_3), 2.87 (1H, s, 4 β -H), 4.90 (1H, m, 3 α -H). (reported mp $117-119^\circ$)⁷⁸⁾。ヘキサン-ベンゼン (2:1) で溶出する画分を MeOH から再結晶し 4 β , 5-epoxy-5 β -cholestan-3 β -ol acetate (50) 50 mg を無色針状晶として得。mp $89-90^\circ$ 。 *Anal.* Calcd. $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_3$: C, 78.32; H, 10.88. Found: C, 78.02; H, 10.94. NMR (CDCl_3) δ : 0.68 (3H, s, 18- CH_3), 0.80, 0.91 (9H, s, 21-, 26- and 27- CH_3), 1.04 (3H, s, 19- CH_3), 2.08 (3H, s, - OCOCH_3), 3.13 (1H, d, $J=3\text{Hz}$, 4 α -H), 5.07 (1H, m, 3 α -H). (reported mp $97-98^\circ$)⁷⁹⁾。

4 α , 5-Epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol (49a)

(49b) 4.38 g をジオキサン 50 ml に溶かし、30% KOH 5 ml を加え 3 hr 室温撹拌。水を加えて AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる生成物を MeOH から再結晶し (49a) 28 g を無色板状晶として得。mp $123-125^\circ$ 。 *Anal.* Calcd. $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2$: C, 80.54; H, 11.52. Found: C, 80.58; H, 11.53. NMR (CDCl_3) δ : 0.68 (3H, s, 18- CH_3), 0.81, 0.91 (9H, s, 21-, 26- and 27- CH_3), 1.11 (3H, s, 19- CH_3), 2.88 (1H, broad s, 4 β -H), 3.95 (1H, m, 3 α -H). (reported mp $136-137^\circ$)⁸⁰⁾。

4 α , 5-Epoxy-5 α -cholestan-3-one (51)

(49a) 2.8 g をピリジン 3.4 ml に溶かし, CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬 7.0 ml を加え一夜室温撹拌。エーテルで希釈し, 10% AcOH, 10% Na₂CO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を MeOH から再結晶し (51) 1.75 g を無色板状晶として得。mp 121-123°. *Anal.* Calcd. C₂₇H₄₄O₂: C, 80.94; H, 11.07. Found: C, 80.87; H, 10.96. NMR (CDCl₃) δ : 0.69 (3H, s, 18-CH₃), 0.80, 0.90 (9H, s, 21-, 26- and 27-CH₃), 1.04 (3H, s, 19-CH₃), 3.00 (1H, s, 4 β -H). (reported mp 123-124.5°)⁸⁰.

5 α -Cholest-3-en-5-ol (52)

(51) 10.6 mg を NH₂NH₂·H₂O 1 ml と 90° に 5 min 加熱。水を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を含水 MeOH から再結晶し (52) 8.2 mg を無色板状晶として得。mp 75-76°. NMR (CDCl₃) δ : 0.68 (3H, s, 18-CH₃), 0.83, 0.94 (12H, s, 19-, 21-, 26- and 27-CH₃), 5.60 (2H, s, 3- and 4-H). (reported mp 75-76°)⁸¹.

(52) の Hydration 反応

(52) 10.6 mg を (46) と同様に B₂H₆ を用いる hydration 反応に付す。得られる生成物をベンゼン-AcOEt (3:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.49 の画分を MeOH から再結晶し (53) 10 mg を無色葉状晶として得。mp 196-197°. R_f 値 0.18 の画分を MeOH から再結晶し (45a) 3.2 mg を無色針状晶として得。mp 217-219°. (53) および (45a) はいずれも標品と混融し融点降下を認めず。

5 α -Hydroxycholestan-3-one (54)

(53) 30.0 mg をピリジン 5 ml に溶かし, CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬 10 ml を加え 23 hr 室温撹拌。エーテルで希釈し, 10% AcOH, 10% Na₂CO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をアセトンから再結晶し (54) 17.9 mg を無色葉状晶として得。mp 227-228°. *Anal.* Calcd. C₂₇H₄₆O₂: C, 80.54; H, 11.52. Found: C, 80.56; H, 11.51. NMR (CDCl₃) δ : 0.68 (3H, s, 18-CH₃), 0.80, 0.90 (9H, s, 21-, 26- and 27-CH₃), 1.16 (3H, s, 19-CH₃). (reported mp 222-223°)⁸².

(54) の NaBH₄ 還元

(54) 10 mg を MeOH 4 ml に溶かし, 氷冷下 NaBH₄ 40 mg の水溶液 0.2 ml を加え 5 min 撹拌。過剰の試薬を AcOH で分解し AcOEt で抽出。有機層を 5% NaHCO₃, 水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をベンゼン-AcOEt (3:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.49 の画分を MeOH から再結晶し (53) 2 mg を無色葉状晶として得。mp 197-199.5°. R_f 値 0.18 の画分を MeOH から再結晶し (45a) 5 mg を無色針状晶として得。

mp 218–219°. (53) および (45a) はそれぞれ標品と混融し融点降下を認めず。

5 α -Cholestane-3 β , 5-diol 3-Acetate (45b)

(45a) を Ac₂O-ピリジンで常法通りアセチル化。MeOH から再結晶し (45b) を無色葉状晶として得。mp 186–187°. *Anal.* Calcd. C₂₉H₅₀O₃: C, 77.97; H, 11.28. Found: C, 77.98; H, 11.29. NMR (CDCl₃) δ : 0.65 (3H, s, 18-CH₃), 0.81, 0.92 (9H, s, 21-, 26- and 27-CH₃), 1.00 (3H, s, 19-CH₃), 2.02 (3H, s, -OCOCH₃), 5.05 (1H, m, 3 α -H) (reported mp 184–186°)⁸³.

(45b) の脱水と加水分解

(45b) 87mg をピリジン 1.5 ml に溶かし氷冷下 SOCl₂ 0.2 ml の CHCl₃ 溶液 1 ml を加え 5 min 搅拌。含水 AcOEt で過剰の試薬を分解後 AcOEt で抽出。有機層を 5% NaHCO₃, 水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をジオキサン 3 ml に溶かし, 30% KOH 1 ml を加え一夜室温放置。水を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をベンゼン-AcOEt (5:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.40 の画分を MeOH から再結晶し cholesterol 33mg を無色葉状晶として得。mp 145–147°. R_f 値 0.47 の画分を MeOH から再結晶し cholest-4-en-3 β -ol 20mg を無色針状晶として得。mp 125–127°. これらはいずれも標品と混融し融点降下を認めず。

2 α -d₁-5 α -Cholestane-3 β , 5-diol (56)

(46) 1.46g を無水 THF 60 ml に溶かし氷冷搅拌下, LiAlD₄ 1.2g と BF₃-etherate 1.6g より発生させた B₂D₆ ガスを 4 hr にわたって通導する。含水エーテルで過剰の試薬を分解しエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる油状物を THF 60 ml に溶かし氷冷下 10% NaOH 30 ml, 30% H₂O₂ 23 ml を加え 0° で 2 hr 搅拌。AcOEt で抽出, 有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーに付す。ヘキサノン-ベンゼン (1:3) 溶出画分から 2 α -d₁-5 α -cholestane-3 α , 5-diol (55) 260mg を無色無晶形物質として得。ベンゼン溶出画分をベンゼン-AcOEt (3:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製し, さらに (55) 77mg を得。(55) 337mg をピリジン 5 ml に溶かし, CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬 8.5 ml を加え一夜室温放置。エーテルで希釈し, 10% AcOH, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去して 2 α -d₁-5 α -hydroxycholestan-3-one を得。これを MeOH 20 ml に溶かし氷冷下 NaBH₄ 600mg の水溶液 1 ml を加え 0° で 2 hr 搅拌。10% AcOH で過剰の試薬を分解し AcOEt で抽出。有機層を 5% NaHCO₃, 水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をベンゼン-AcOEt (3:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.18 の画分から (56) 80mg を無色無晶形物質として得。

2 α -d₁-Cholesterol (57)

(56) 80 mg を Ac₂O-ピリジンで常法通りアセチル化。得られる 3-acetate をピリジン 1 ml に溶かし氷冷下 SOCl₂ 0.2 ml の CHCl₃ 溶液 1 ml を加え 5 min 攪拌。含水 AcOEt で過剰の試薬を分解し AcOEt で抽出。有機層を 5% NaHCO₃、水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物を 3% MeOH 性 KOH に溶かし 37° で一夜攪拌。AcOEt で抽出し有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をベンゼン-AcOEt (5:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。MeOH から再結晶し (57) 33 mg を無色針状晶として得。mp 148-149.5°。Cholesterol と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 387 (M⁺) (93% d₁)。

2 β -d₁-5 α -Cholestane-3 β , 5-diol (59)

(47) 1 g を THF 30 ml に溶かし LiAlD₄ 800 mg を加え 40 min 加熱還流。含水 AcOEt で過剰の試薬を分解。20% ロッセル塩溶液を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去し 2 β -d₁-5 α -cholestane-3 α , 5-diol (58) 1.022 g を無色無晶形物質として得。これを精製することなくピリジン 14 ml に溶かし CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬 20 ml を加え (55) と同様に酸化し 2 β -d₁-5 α -hydroxycholestan-3-one 600 mg を得。得られた 3-keto 体を MeOH 40 ml に溶かし NaBH₄ 2 g で先と同様に還元。得られる生成物を preparative TLC で精製し (59) 380 mg を無色無晶形物質として得。

2 β -d₁-Cholesterol (60)

(59) 380 mg を (56) と同様にアセチル化、脱水、ついで加水分解に付し (60) 62 mg を無色葉状晶として得。mp 147.5-148°。Cholesterol と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 387 (M⁺) (97.5% d₁)。

4 α -d₁-5 α -Cholestane-3 β , 5-diol (62)

(52) 2 g を LiAlD₄ 2.5 g と BF₃ etherate 10.5 g より発生させた B₂D₆ ガスを用い (46) と同様に deuteration。得られる 4 α -d₁-5 α -cholestane-3 α , 5-diol (61) を先と同様に CrO₃ 酸化, NaBH₄ 還元 に付し (62) 20 mg を得。

4 α -d₁-Cholesterol (63)

(62) 20 mg を (56) と同様にアセチル化、脱水、ついで加水分解に付し (63) 7 mg を無色葉状晶として得。mp 148-149°。Cholesterol と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 387 (M⁺) (96.5% d₁)。

4 β -d₁-5 α -Cholestane-3 β , 5-diol (64)

(49b) 500 mg を LiAlD₄ 750 mg で還元。(47) と同様に処理し (64) 435 mg を無色無晶形物質として得。

4 β -d₁-Cholesterol (65)

(64) 435 mg を (56) と同様にアセチル化, 脱水, ついで加水分解に付し (65) 181 mg を無色葉状晶として得。mp 147.5–148°. Cholesterol と混融し融点降下を認めず。MS m/e : 387 (M⁺) (98.4% d₁)。

第4章第3節付属実験

Materials

基質の epimeric 2- および 4-d₁-cholesterols (57, 60, 63, 65) は第4章第2節で合成したものを用了。

微生物変換

培地は corn steep liquor 1.0%, meat extract 0.2%, および K₂HPO₄ 0.05% を溶かし精製水で全量を 1 L に調製する。 *Arthrobacter simplex* IAM (1660) を液体培地 100 ml に接種し 30° で 2 日間振盪培養する。新たに調製した培地 10 ml にこの種培養液 0.4 ml を加え 30° で 21 hr 培養。ついで基質 5 mg を DMF 0.1 ml に溶かし培養液に添加。6 hr 後に α , α' -dipyridyl 1.6 mg を加え, さらに 47 hr インキュベートする。

抽出ならびに分離

インキュベーション混合物を AcOEt 20 ml で 3 回抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をベンゼン-エーテル (1:1) を展開溶媒とする preparative TLC に付す。R_f 値 0.40 の画分から ADD を約 27% の変換率で得。(57), (60) および (65) から得られた ADD の NMR スペクトルデータは以下に示すとおりであった。

Substrate	C ₁ -H	C ₂ -H	C ₄ -4
(57)	6.82 (broad s)	—	5.85 (s)
(60)	6.82 (d, J=10Hz)	6.01 (dd, J=10, 1Hz)	5.84 (s)
(65)	6.82 (d, J=10Hz)	6.01 (dd, J=10, 1Hz)	5.84 (s)

第5章第2節付属実験

6 β -d₁-5 α -Cholestan-3 β , 5-diol (67a)

5, 6 α -Epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol (66) 450 mg を無水 THF 10 ml に溶かし, LiAlD₄ 300 mg を加え 2.5 hr 加熱還流。含水 AcOEt で過剰の試薬を分解。20% ロッセル塩溶液を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を MeOH から再結晶し (67a) 305 mg を無色葉状晶として得。mp 218–219°. 5 α -Cholestan-

3 β , 5-diol (45a) と混融し融点降下を認めず。

6 β -d₁-5 α -Hydroxycholestan-3-one (68a)

(67a) 130mg をピリジン 4 ml に溶かし, CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬 5 ml を加え 5 hr 室温放置。AcOEt で希釈し 10% AcOH, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質をアセトンから再結晶し (68a) 113mg を無色葉状晶として得。mp 227-228°. 5 α -Hydroxycholestan-3-one (54) と混融し融点降下を認めず。

6 β -d₁-Cholest-4-en-3-one (69a)

(68a) 17mg をベンゼン 5 ml に溶かし, 無水 p-TsOH 8 mg を加え 42 hr 室温撈拌。AcOEt で希釈し 5% NaHCO₃, 水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサン-AcOEt (6:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。MeOH から再結晶し (69a) 10mg を無色板状晶として得。mp 80.5-81°. Cholest-4-en-3-one と混融し融点降下を認めず。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 2140 (C-D). NMR (CDCl₃) δ : 0.71 (3H, s, 18-CH₃), 0.87 (6H, d, J=6Hz, 26- and 27-CH₃), 0.92 (3H, d, J=6Hz, 21-CH₃), 1.17 (3H, s, 19-CH₃), 5.70 (1H, s, C₄-H), MS m/e : 385 (M⁺) (98% d₁).

6-d₁-Cholest-5-en-3 β -ol Acetate (72)

3 α , 5-Cyclo-5 α -cholestan-6-one (70) 1g を無水 THF 10 ml に溶かし, LiAlD₄ 300mg を加え 1.5 hr 加熱還流。含水 AcOEt で過剰の試薬を分解。20% ロッシェル塩溶液を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い, 無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物を無水 エーテル 50 ml に溶かし氷冷下 AcOH 15 ml, BF₃-etherate 15 ml を徐々に滴下。1.5 hr 0° で撈拌, エーテルで抽出。有機層を 5% NaHCO₃, 水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を精製することなくつぎの反応に付す。一部を MeOH から再結晶し (72) を無色葉状晶として得。mp 114-115°. Cholest-5-en-3 β -ol acetate と混融し融点降下を認めず。NMR (CDCl₃) δ : 0.68 (3H, s, 18-CH₃), 0.87 (6H, d, J=6Hz, 26- and 27-CH₃), 0.92 (3H, d, J=6Hz, 21-CH₃), 1.03 (3H, s, 19-CH₃), 2.05 (3H, s, -OCOCH₃), 4.64 (1H, m, 3 α -H).

6 α -d₁-5 α -Cholestane-3 β , 5-diol (67b)

(72) 1g をベンゼン 20 ml に溶かし m-クロル過安息香酸 400mg を加え一夜室温撈拌。AcOEt で希釈し 5% NaHSO₃, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物を無水 THF 10 ml に溶かし, LiAlH₄ 300mg を加え 2 hr 加熱還流。含水 AcOEt で過剰の試薬を分解。20% ロッシェル塩溶液を加え AcOEt で抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーに付す。ヘキサン-AcOEt (5:1) 溶出画分を MeOH から再結晶し (67b) 424mg を無色葉状晶として得。

mp 218–219°. 5 α -Cholestane-3 β , 5-diol (45a) と混融し融点降下を認めず。

6 α -d₁-5 α -Hydroxycholestan-3-one (68b)

(67b) 120 mg を CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬を用い (67a) と同様に酸化。アセトンから再結晶し (68b) 92 mg を無色葉状品として得。mp 227–228°. 5 α -Hydroxycholestan-3-one (54) と混融し融点降下を認めず。

6 α -d₁-Cholest-4-en-3-one (69b)

(68b) 93 mg をベンゼン 15 ml に溶かし、無水 p-TsOH 50 mg を用い (68a) と同様に脱水反応に付す。得られる生成物をヘキサノン-AcOEt (6:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。MeOH から再結晶し (69b) 58 mg を無色板状品として得。mp 80.5–81°. Cholest-4-en-3-one と混融し融点降下を認めず。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 2150 (C-D). NMR (CDCl₃) δ : 0.71 (3H, s, 18-CH₃), 0.86 (6H, d, J=6 Hz, 26- and 27-CH₃), 0.90 (3H, d, J=6 Hz, 21-CH₃), 1.18 (3H, s, 19-CH₃), 5.68 (1H, d, J=1.5 Hz, C₄-H). MS m/e : 385 (M⁺) (98% d₁).

第5章第3節付属実験

Materials

IR スペクトルの比較上標品として必要な epimeric 6-d₁-cholestenone (69a, 69b) は第5章第2節で、基質の 4 β -d₁-cholesterol (65) は第4章第2節で合成したものを用いた。

6-d₁-Cholesterol (73)

6-d₁-Cholest-5-en-3 β -ol acetate (72) 310 mg を THF 3 ml-MeOH 6 ml に溶かし、30% KOH 1 ml を加え 10 min 室温放置。AcOEt で抽出し有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質を MeOH から再結晶し (73) 226 mg を無色葉状品として得。mp 147.5–148°. Cholesterol と混融し融点降下を認めず。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 2240 (C-D). MS m/e : 387 (M⁺) (98% d₁).

5 α -Cholestane-3 β , 4 α -diol 3-*tert*-Butyldimethylsilyl Ether (75b)

Cholest-4-en-3 β -ol *tert*-butyldimethylsilyl ether (74a)³⁶⁾ 300 mg を無水エーテル 18 ml に溶かし LiAlH₄ 360 mg を加え、氷冷下 N₂ ガス気流中 BF₃-etherate 3 θ のエーテル溶液 18 ml を 15 min にわたって滴下、さらに 1 hr 室温攪拌。含水エーテルで過剰の試薬を分解しエーテルで抽出。有機層を 5% NaHCO₃、水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる油状物を THF 10 ml に溶かし氷冷下 10% NaOH 4 ml, 30% H₂O₂ 3 ml を徐々に滴下、さらに 0° で 1 hr 攪拌。水を加えエーテルで抽出。有機層を 5% NaHSO₃, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサノン-AcOEt (100:1) を展開溶媒

とする preparative TLC で精製。エーテル-MeOH から再結晶し (75b) 210 mg を無色葉状晶として得。mp 197-198°. $[\alpha]_D^{22} + 2.00^\circ$ ($c = 0.20$). *Anal.* Calcd. $C_{33}H_{62}O_2Si$: C, 76.38; H, 12.04. Found: C, 76.28; H, 12.08. NMR ($CDCl_3$) δ : 0.08 (6H, s, Si (CH_3)₂), 0.64 (3H, s, 18- CH_3), 0.90 (9H, s, *tert*- C_4H_9), 3.1-3.5 (2H, m, 3 α - and 4 β -H).

(75b) の加水分解

(75b) 5 mg をアセトン 5 ml に溶かし 5 N HCl 0.05 ml を加え 30 min 60° で放置。5% NaHCO₃ で中和後、溶媒留去しエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサン-AcOEt (4:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。MeOH から再結晶し 5 α -cholestane-3 β , 4 α -diol (75a) 3 mg を無色葉状晶として得。mp 232-234°. (reported mp 236-238°)⁸⁴⁾.

3 β -Hydroxy-5 α -cholestan-4-one *tert*-Butyldimethylsilyl Ether (76)

Pyridinium chlorochromate 1 g と AcONa 75 mg の CH₂Cl₂ 懸濁液 5 ml に (75b) 500 mg の CH₂Cl₂ 溶液 5 ml を加え 14 hr 室温攪拌。無水エーテルを加えアルミナをつめたグラスフィルターで濾過。濾液を濃縮。得られる結晶性物質を MeOH から再結晶し (76) 400 mg を無色葉状晶として得。mp 135-138°. $[\alpha]_D^{21} + 1.9^\circ$ ($c = 0.27$). *Anal.* Calcd. $C_{33}H_{60}O_2Si$: C, 76.68; H, 11.70. Found: C, 76.48; H, 11.89. NMR ($CDCl_3$) δ : 0.12 (6H, s, Si (CH_3)₂), 0.64 (3H, s, 18- CH_3), 0.71 (3H, s, 19- CH_3), 0.89 (9H, s, *tert*- C_4H_9), 4.15 (1H, dd, $J = 7, 10.5$ Hz, 3 α -H).

5 α -Cholestane-3 β , 4 β -diol 3-*tert*-Butyldimethylsilyl Ether (77b)

(76) 70 mg を無水エーテル 5 ml に溶かし, LiAlH₄ 30 mg を加え 40 min 室温で攪拌。含水エーテルで過剰の試薬を分解。20% ロッセル塩溶液を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物を DMF 2 ml-ピリジン 1 ml に溶かし imidazole 400 mg, *tert*-butyldimethylsilyl chloride 200 mg を加え室温 3 hr 放置。水を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na₂SO₄ で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサン-ベンゼン (2:1) を展開溶媒とする preparative TLC で精製。エーテル-MeOH から再結晶し (77b) 52 mg を無色葉状晶として得。mp 185-187°. $[\alpha]_D^{21} + 1.40^\circ$ ($c = 0.58$). *Anal.* Calcd. $C_{33}H_{62}O_2Si \cdot \frac{1}{2} H_2O$: C, 75.08; H, 12.03. Found: C, 74.65; H, 11.65. NMR ($CDCl_3$) δ : 0.06 (6H, s, Si (CH_3)₂), 0.64 (3H, s, 18- CH_3), 0.89 (9H, s, *tert*- C_4H_9), 1.03 (3H, s, 19- CH_3), 3.40-3.72 (2H, m, 3 α - and 4 α -H).

(77b) の CrO₃ 酸化

(77b) 30 mg をピリジン 1 ml に溶かし, CrO₃-ピリジン (1:10 w/v) 試薬 1 ml を加え 5 hr 室

温で攪拌。エーテルで希釈し10% AcOH, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサン-ベンゼン(2:1)を展開溶媒とする preparative TLCで精製。エーテル-MeOHから再結晶し(76) 22 mgを無色葉状晶として得。mp 128.5-130°。標品と混融し融点降下を認めず。

(77b) の加水分解

(77b) 10 mgをMeOHに溶かし, 5 N HClを用い(75b)と同様に加水分解。MeOHから再結晶し5 α -cholestane-3 β , 4 β -diol(77a) 7 mgを無色針状晶として得。mp 198-201° (reported 199-201°)⁸⁵⁾。

(77b) の脱水

(77b) 10 mgをピリジン1 mlに溶かし氷冷下POCl₃ 0.2 mlを加え一夜室温で攪拌。含水エーテルで過剰の試薬を分解しエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をヘキサンを展開溶媒とする preparative TLCで精製。エーテル-MeOHから再結晶し(74a) 6 mgを無色葉状晶として得。mp 111-112°。標品と混融し融点降下を認めず。

4 α -d₁-5 α -Cholestane-3 β , 4 β -diol 3-*tert*-Butyldimethylsilyl Ether (77c)

(76) 1.4 gを無水エーテル30 mlに溶かし, LiAlD₄ 600 mgを加え30 min室温攪拌。含水エーテルで過剰の試薬を分解後20% ロッシェル塩溶液を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をDMF 8 ml-ピリジン4 mlに溶かし*tert*-butyldimethylsilyl chloride 2.2 g, imidazole 4.5 gを加え3 hr室温攪拌。水を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーに付す。ヘキサン-ベンゼン(2:1)で溶出する画分より結晶性物質1.25 gを得。このものは精製することなくつぎの反応に付す。一部をエーテル-MeOHから再結晶し(77c)を無色葉状晶として得。mp 193-194°。(77b)と混融し融点降下を認めず。

4-d₁-Cholest-4-en-3 β -ol *tert*-Butyldimethylsilyl Ether (74b)

(77c) 1.25 gをピリジンに溶かしPOCl₃を用い(77b)と同様に脱水反応を行ない、得られる生成物をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーに付す。ヘキサン-AcOEt(50:1)で溶出する画分より結晶性物質1 gを得。一部をMeOHから再結晶し(74b)を無色葉状晶として得。mp 111-114°。(74a)と混融し融点降下を認めず。NMR(CDCl₃) δ : 0.08(6H, s, Si(CH₃)₂), 0.67(3H, s, 18-CH₃), 0.89(9H, s, *tert*-C₄H₉), 1.03(3H, s, 19-CH₃), 4.20(1H, m, 3 α -H)。

4 α , 5-Epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol *tert*-Butyldimethylsilyl Ether (78a)

4 α , 5-Epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol(49a) 40 mgをDMF 0.5 ml-ピリジン0.2 mlに溶かし, imidazole 200 mg, *tert*-butyldimethylsilyl chloride 100 mgを加え10 min室温

撹拌。水を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をエーテル-MeOHから再結晶し(78a) 45 *mg* を無色葉状晶として得。mp 176.5–178°。 $[\alpha]_D^{13} + 5.00^\circ$ ($c = 0.38$)。 *Anal.* Calcd. $\text{C}_{33}\text{H}_{60}\text{O}_2\text{Si}$: C, 76.68; H, 11.70. Found: C, 76.62; H, 11.84. NMR(CDCl_3) δ : 0.08 (6H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.67 (3H, s, 18- CH_3), 0.89 (9H, s, *tert*- C_4H_9), 1.08 (3H, s, 19- CH_3), 2.82 (1H, s, 4 β -H), 3.90 (1H, m, 3 α -H)。

4 β , 5-Epoxy-5 β -cholestan-3 β -ol *tert*-Butyldimethylsilyl Ether (79b)

4 β , 5-Epoxy-5 β -cholestan-3 β -ol (79a)⁸⁶⁾ 30 *mg* を(49a)と同様にシリル化。MeOHから再結晶し(79b) 33 *mg* を無色葉状晶として得。mp 89–89.5°。 $[\alpha]_D^{16} + 1.5^\circ$ ($c = 0.49$)。 *Anal.* Calcd. $\text{C}_{33}\text{H}_{60}\text{O}_2\text{Si}$: C, 76.68; H, 11.70. Found: C, 76.46; H, 11.89. NMR(CDCl_3) δ : 0.05, 0.06 (each 3H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.70 (3H, s, 18- CH_3), 0.96 (9H, s, *tert*- C_4H_9), 1.07 (3H, s, 19- CH_3), 3.01 (1H, d, $J = 3\text{ Hz}$, 4 α -H), 4.08 (1H, m, 3 α -H)。

5 α -Cholestane-3 β , 5-diol 3-*tert*-Butyldimethylsilyl Ether (80b)

5 α -Cholestane-3 β , 5-diol (80a)⁸⁶⁾ 100 *mg* を(49a)と同様にシリル化。エーテル-MeOHから再結晶し(80b) 114 *mg* を無色針状晶として得。mp 186–188°。 $[\alpha]_D^{21} - 11.9^\circ$ ($c = 0.21$)。 *Anal.* Calcd. $\text{C}_{33}\text{H}_{62}\text{O}_2\text{Si}$: C, 76.68; H, 11.70. Found: C, 76.35; H, 12.10. NMR(CDCl_3) δ : 0.04 (6H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.64 (3H, s, 18- CH_3), 0.89 (9H, s, *tert*- C_4H_9), 0.99 (3H, s, 19- CH_3), 4.08 (1H, m, 3 α -H)。

(74b) のエポキシ化反応

(74b) 1 *g* をベンゼン 20 *ml* に溶かし m-クロロ過安息香酸 500 *mg* を加え 1.5 hr 室温撹拌。エーテルで希釈し、5% NaHSO_3 、5% NaHCO_3 、水で順次洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーに付す。ヘキサン-ベンゼン(3:1)で溶出。さきに溶出される画分をエーテル-MeOHから再結晶し 4 β - d_1 -4 α , 5-epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol *tert*-butyldimethylsilyl ether (78b) 845 *mg* を無色葉状晶として得。mp 176–177°。(78a)と混融し融点降下を認めず。後に溶出される画分をMeOHから再結晶し 4 α - d_1 -4 β , 5-epoxy-5 β -cholestan-3 β -ol *tert*-butyldimethylsilyl ether (79c) 52 *mg* を無色葉状晶として得。mp 88–89°。(79b)と混融し融点降下を認めず。

4 α - d_1 -5 α -Cholestane-3 β , 5-diol 3-*tert*-Butyldimethylsilyl Ether (80c)

(78b) 900 *mg* を無水エーテル 30 *ml* に溶かし LiAlH_4 700 *mg* を加え 30 hr 加熱還流。含水エーテルで過剰の試薬を分解。20% ロッセル塩溶液を加えエーテルで抽出。有機層を水で洗い無水 Na_2SO_4 で乾燥。溶媒留去後得られる結晶性物質 820 *mg* を精製することなくつぎの反応に付

す。一部をMeOHから再結晶し(80c)を無色針状晶として得。mp 186-188°. (80b)と混融し融点降下を認めず。

4 α -d₁-Cholesterol (81)

(80c) 820 mgをピリジン10 mlに溶かし氷冷下SOCl₂ 0.8 mlのCHCl₃溶液0.8 mlを加え5min 0°で攪拌。含水エーテルで過剰の試薬を分解しエーテルで抽出。有機層を5% NaHCO₃, 水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥, 溶媒留去。得られる生成物をアセトン10 ml-エーテル10 mlに溶かし30min 60°で加熱。5% NaHCO₃で中和し溶媒留去後AcOEtで抽出。有機層を水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥。溶媒留去後得られる生成物をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーに付す。ヘキサン-AcOEt (10:1)溶出画分をMeOHから再結晶し(81) 234 mgを無色葉状晶として得。mp 145-146.5°. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr cm}^{-1}}$: 2175 (C-D). Cholesterolと混融し融点降下を認めず。MS m/e : 387 (M⁺) (98% d₁)。

基質のNMRスペクトル

CCl₄中Eu(fod)₃をシフト試薬に用いモル比0.21で測定した非標識および重水素化cholesterols (65, 73, 81)のNMRスペクトルデータは以下に示すとおりであった。

Compound	Chemical shift (δ) ppm		
	4 α -H	4 β -H	6-H
Cholesterol	5.24 (m)	5.48 (m)	5.90 (broad d, J=4Hz)
4 α -D (81)		5.74 (m)	5.96 (broad s)
4 β -D (65)	5.14 (m)		5.92 (broad d, J=4Hz)
6-D (93)	5.38 (m)	5.68 (m)	

インキュベーション

基質20 mgを95% EtOH 0.2 mlに溶かし3 β -hydroxysteroid oxidase [E.C. 1.1.3.6] 4 mg, 0.03 Mリン酸緩衝液(pH 7.2) 6.0 mlを加え21 hr 37°でインキュベート。インキュベーション混合物をAcOEtで抽出。有機層を水で洗い無水Na₂SO₄で乾燥, 溶媒留去。得られる生成物をヘキサン-AcOEt (5:1)を展開溶媒とする preparative TLCで精製。MeOHから再結晶しcholestenoneを無色板状晶として得(収率95%)。Cholestenoneのマスマスペクトル

の解析により得られた重水素保持率を Table IV に示した。またこれら生成物の NMR スペクトルデータは以下に示すとおりであった。

Product	Substrate		
	4 α -D	4 β -D	6-D
Cholestenone	disappeared	5.76 (s, $W^1/2=1.5\text{Hz}$)	5.76 (d, $J=2\text{Hz}$)

重水素交換

Cholestenone および 6 β - d_1 -cholestenone をつぎに示す条件下 21 hr 3 $^\circ$ でインキュベートした。生成物の cholestenone を先と同様にして単離した。そのマスペクトルの解析により得られた重水素保持率を Table V に示した。

Cholestenone		EtOH	Enzyme	Medium	
	mg				ml
6 β -D	4.4	0.2 a)	2	H ₂ O	5
Non-D	5.6	0.2 b)	2	D ₂ O	5
6 β -D	5.1	0.2 a)	none	H ₂ O	5
Non-D	5.7	0.2 b)	none	D ₂ O	5

Enzyme : cholesterol oxidase, H₂O : 0.03M phosphate buffer (pH 7.2), D₂O : 0.03M phosphate buffer in D₂O (pH 7.2).

a) 99% EtOH, b) 95% EtOH.

引用文献

- 1) H. Iizuka and A. Naito, "Microbial Transformations of Steroids and Alkaloids," University of Tokyo Press, Tokyo, 1967.
- 2) K. J. Ryan, *J. Biol. Chem.*, **234**, 268 (1959); R. A. Meigs and K. J. Ryan, *ibid.*,

246, 83 (1971).

- 3) P. Talalay, *Annu. Rev. Biochem.*, **34**, 347 (1965).
- 4) T. Morato, K. Raab, H. J. Brodie, M. Hayano, and R. I. Dorfman, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3764 (1962).
- 5) J. D. Townsley and H. J. Brodie, *Biochemistry*, **7**, 33 (1968).
- 6) H. J. Brodie, G. Possanza, and J. D. Townsley, *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 770 (1968).
- 7) H. J. Brodie, K. J. Kripalani, and G. Possanza, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1241 (1969).
- 8) J. Fishman and H. Guzik, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2805 (1969).
- 9) J. Fishman, H. Guzik, and D. Dixon, *Biochemistry*, **8**, 4304 (1969).
- 10) R. Bentley, "Molecular Asymmetry in Biology," Vol. II, Academic Press, New York, 1970, pp. 334-340.
- 11) M. Hayano, H. J. Ringold, V. Stefanovic, M. Gut and R. I. Dorfman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **4**, 454 (1961).
- 12) H. J. Ringold, M. Hayano, and V. Stefanovic, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1960 (1963).
- 13) R. Jerussi and H. J. Ringold, *Biochemistry*, **4**, 2113 (1965).
- 14) J. S. McGuire, Jr. and G. M. Tomkins, *Fed. Proc.*, **19**, A-29 (1960).
- 15) O. Berseus and I. Björkhem, *Eur. J. Biochem.*, **2**, 503 (1967).
- 16) I. Björkhem, *Eur. J. Biochem.*, **7**, 413 (1969).
- 17) I. Björkhem, *Eur. J. Biochem.*, **8**, 345 (1969).
- 18) I. Björkhem, and H. Danielsson, *Eur. J. Biochem.*, **12**, 80 (1970).
- 19) Y. J. Abul-Hajj, *Steroids*, **20**, 215 (1972).
- 20) K. Nozu and B. Tamaoki, *Acta Endocrinol.*, **76**, 608 (1974).
- 21) I. Björkhem, J. Å. Gustafsson, and Ö. Wrange, *Eur. J. Biochem.*, **37**, 143 (1973).
- 22) Y. J. Abul-Hajj, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 766 (1971).
- 23) T. Nambara, H. Hosoda, T. Anjyo, and S. Ikegawa, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **20**, 2256 (1972).
- 24) D. N. Kirk and M. P. Hartshorn, "Steroid Reaction Mechanisms," Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1968, p. 77, 112.
- 25) N. S. Bhacca and D. H. Williams, "Application of NMR Spectroscopy in Or-

- ganic Chemistry," Holden-Day, Inc., San Francisco, 1964, p.77.
- 26) A. S. Gupta and S. Dev, *J. Chromatogr.*, **12**, 189 (1963).
 - 27) R. Ikan, *J. Chromatogr.*, **17**, 591 (1965).
 - 28) R. Ikan and M. Gudzinovaski, *J. Chromatogr.*, **18**, 422 (1965).
 - 29) S. Ikegawa and T. Nambara, *Chem. Ind. (London)*, **1973**, 230.
 - 30) T. Nambara, S. Ikegawa and H. Hosoda, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **21**, 2794 (1973).
 - 31) C. J. Sih and R. E. Bennett, *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 584 (1962).
 - 32) Y. J. Abul-Hajj, *J. Biol. Chem.*, **247**, 686 (1972).
 - 33) T. Nambara, S. Ikegawa, and C. Takahashi, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **23**, 2358 (1975).
 - 34) L. Tokes and L. J. Throop, "Organic Reactions in Steroid Chemistry," Vol. I, ed. by J. Fred and J. A. Edwards, Reinhold, New York, 1972, pp.145-221.
 - 35) L. Caglioti, G. Cainelli, G. Maina, and A. Selva, *Tetrahedron*, **20**, 957 (1964).
 - 36) H. Hosoda, K. Yamashita, H. Sagae, and T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **23**, 2118 (1975).
 - 37) N. Bruchofsky and J. D. Wilson, *J. Biol. Chem.*, **243**, 2012 (1968).
 - 38) R. E. Sievers, "Nuclear Magnetic Resonance Shift Reagents," Academic Press, New York, 1973.
 - 39) A. F. Cockeill, G. L. O. Davies, R. C. Harden, and D. M. Rackham, *Chem. Rev.*, **73**, 553 (1973).
 - 40) H. Hosoda, K. Yamashita, S. Ikegawa, and T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **25**, 2545 (1977).
 - 41) T. Nambara, S. Ikegawa, and H. Ishida, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **24**, 2486 (1976).
 - 42) C. Djerassi and M. A. Kielczewski, *Steroids*, **2**, 125 (1963).
 - 43) J. Gutzwiller and C. Djerassi, *Helv. Chim. Acta*, **49**, 2018 (1966).
 - 44) T. Nambara, S. Ikegawa, H. Ishida, and H. Hosoda, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **25**, 3415 (1977).
 - 45) T. L. Miller and E. J. Hessler, *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 354 (1970).
 - 46) D. C. Wilton, *Biochem. J.*, **155**, 487 (1976).
 - 47) M. Nagasawa, M. Bae, G. Tamura, and K. Arima, *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*,

33, 1644 (1969).

- 48) M. Nagasawa, H. Hashiba, N. Watanabe, M. Bae, G. Tamura, and K. Arima, *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*, **34**, 801 (1970).
- 49) T. Nambara, S. Ikegawa, T. Ishizuka, and J. Goto, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **22**, 2656 (1974).
- 50) S. Achmatowicz, D.H.R. Barton, P.D. Magnus, C.A. Poulton, and P.J. West, *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1973**, 1567.
- 51) G.M. Segal, T.S. Fradkina, and I.V. Torgov, *Khim. Priro. Soedin*, **1965**, 251.
- 52) T. Nambara, S. Ikegawa, and M. Kato, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **23**, 2164 (1975).
- 53) G.T. Philips and F.P. Ross, *Eur. J. Biochem.*, **44**, 603 (1974).
- 54) H. Werbin and I.L. Chaikoff, *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 471 (1963).
- 55) H. Werbin and I.L. Chaikoff, *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 581 (1964).
- 56) N.L. Oleinick and S.B. Koritz, *Biochemistry*, **5**, 3400 (1966).
- 57) H.L. Bradlow, D.K. Fukushima, B. Zumoff, and L. Hellman, *Steroids*, **11**, 273 (1968).
- 58) D.K. Fukushima, H.L. Bradlow, T. Yamauchi, A. Yagi, and D. Koerner, *Steroids*, **11**, 541 (1968).
- 59) S.K. Malhotra and H.J. Ringold, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3228 (1965).
- 60) C.C. Allain, L.S. Poon, C.S.G. Chan, W. Richmond, and P.C. Fu, *Clin. Chem.*, **20**, 470 (1974).
- 61) Y. Yamaguchi, K. Tateishi, and C. Hayashi, *Clin. Chim. Acta*, **66**, 449 (1976).
- 62) T. Nambara, S. Ikegawa, T. Hirayama, and H. Hosoda, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **25**, 3093 (1977).
- 63) J.C. Jacquesy, R. Jacquesy, and J. Levisalles, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1976**, 1649.
- 64) S.K. Malhotra and H.J. Ringold, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1538 (1963).
- 65) C.C. Beard, "Organic Reaction in Steroid Chemistry," Vol. I, ed. by J.A. Edwards, Reinhold, New York, 1972, pp. 304-308.
- 66) T.A. Wittstruck, S.K. Malhotra, and H.J. Ringold, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1699 (1963).
- 67) T. Nambara, S. Ikegawa, T. Hirayama, and H. Hosoda, *Chem. Pharm. Bull.*

(Tokyo), in press.

- 68) T.Uwajima, H.Yagi, and O.Terada, *Agric. Biol. Chem.* (Tokyo), **37**, 2345 (1973).
- 69) T.Uwajima, H.Yagi, and O.Terada, *Agric. Biol. Chem.* (Tokyo), **38**, 1149 (1974).
- 70) A.C.de Pault and J.Bascoul, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1966**, 939.
- 71) J.Bascoul and A.C.de Pault, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1969**, 945.
- 72) J.Fajkos and V.Sanda, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **27**, 355 (1962).
- 73) J.Fishman, H.Guzik, and D.Dixon, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2805 (1969).
- 74) H.J.Ringold, E.Batres, O.Mancera, and G.Rosenkranz, *J. Org. Chem.*, **21**, 1432 (1956).
- 75) H.Nakata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **38**, 378 (1965).
- 76) R.B.Clayton, H.B.Henbest, and M.Smith, *J. Chem. Soc.*, **1957**, 1982.
- 77) H.B.Henbest and J.McEntee, *J. Chem. Soc.*, **1961**, 4478.
- 78) H.B.Henbest and R.A.L.Willson, *J. Chem. Soc.*, **1957**, 1958.
- 79) J.M.Coxon, M.P.Hartshorn, and D.N.Kirk, *Tetrahedron*, **20**, 2547 (1964).
- 80) D.J.Collins, *J. Chem. Soc.*, **1959**, 3919.
- 81) E.Glotter, S.Greenfield, and D.Lavie, *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 5261.
- 82) J.F.Eastham, G.B.Miles, and C.A.Krauth, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3114 (1959).
- 83) H.B.Henbest and B.J.Lovell, *J. Chem. Soc.*, **1957**, 1965.
- 84) M.Nussim, Y.Mazur, and F.Sondheimer, *J. Org. Chem.*, **29**, 1120 (1964).
- 85) S.M.Kupchan, P.Slade, R.J.Young, and G.W.A.Milne, *Tetrahedron*, **18**, 499 (1962).
- 86) D.J.Collins, *Aust. J. Chem.*, **16**, 658 (1963).